



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Trabajo de Tesis Doctoral:

Metalofármacos de cobre(II) con hidrazonas. Evaluación de la actividad antitumoral y estudios de mecanismos de acción en modelos *in vitro* e *in vivo* de cáncer de mama y de osteosarcoma humano.

Tesista: Lic. Lucía M. Balsa

Director/a: Prof. Dr. Ignacio E. León

Año: 2023

El presente trabajo de Tesis, para optar al título de Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas, fue realizado en el Centro de Química Inorgánica "Dr. Pedro J. Aymonino", CEQUINOR (CONICET-UNLP) gracias al financiamiento de la Universidad Nacional de La Plata, la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT), y al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET).

Publicaciones científicas y congresos asistidos

Publicaciones científicas:

- Matesanz, Ana I.; Jimenez-Faraco, Eva; Ruiz, María C.; **Balsa, Lucía M.**; Navarro-Ranninger, Carmen; León, Ignacio E.; Quiroga, Adoracion G.
 Mononuclear Pd(II) and Pt(II) complexes with an α -Nheterocyclic thiosemicarbazone: Cytotoxicity, solution behaviour and interaction: Versus proven models from biological media.
 Inorganic Chemistry Frontiers.
 2018 vol.5 n°1. p73 - 83.
- Burgos-Lopez, Y.; Del Plá, J.; **Balsa, L.M.**; León, I.E.; Echeverría, G.A.; Piro, O.E.; García-Tojal, J.; Pisdiez, R.; González-Baró, A.C.; Parajón-Costa, B.S.
 Synthesis, crystal structure and cytotoxicity assays of a copper(II) nitrate complex with a tridentate ONO acylhydrazone ligand. Spectroscopic and theoretical studies of the complex and its ligand.
 INORGANICA CHIMICA ACTA.
 2018 vol.487 n°. p31 - 40.
- Rodríguez, María R.; Del Plá, Julián; **Balsa, Lucía M.**; León, Ignacio E.; Piro, Oscar E.; Echeverría, Gustavo A.; García-Tojal, Javier; Pis-Diez, Reinaldo; Parajón-Costa, Beatriz S.; González-Baró, Ana C.
 Cu(ii) and Zn(ii) complexes with a poly-functional ligand derived from: O -vanillin and thiophene. Crystal structure, physicochemical properties, theoretical studies and cytotoxicity assays against human breast cancer cells.
 NEW JOURNAL OF CHEMISTRY.
 2019 vol.43 n°18. p7120 - 7129.
- Rodríguez, María R.; **Balsa, Lucía M.**; Del Plá, Julián; García-Tojal, Javier; Pis-Diez, Reinaldo; Parajón-Costa, Beatriz S.; León, Ignacio E.; González-Baró, Ana C.
 Synthesis, characterization, DFT calculations and anticancer activity of a new oxidovanadium(iv) complex with a ligand derived from O-vanillin and thiophene.
 NEW JOURNAL OF CHEMISTRY.
 2019 vol.43 n°29. p11784 – 11794
- **Balsa, Lucía M.**; Quispe, Patricia; Baran, Enrique J; Lavecchia, Martin J; León, Ignacio E.
 In silico and in vitro analysis of FAK/MMP signaling axis inhibition by VO-clioquinol in 2D and 3D human osteosarcoma cancer cells.
 METALLOMICS.
 2020 vol.12 n°12. p1931 - 1940.
- **Balsa, Lucía M.**; Ruiz, Maria C.; Santa Maria De La Parra, Lucia; Baran, Enrique J.; León, Ignacio E.
 Anticancer and antimetastatic activity of copper(II)-tropolone complex against human breast cancer cells, breast multicellular spheroids and mammospheres.
 JOURNAL OF INORGANIC BIOCHEMISTRY.
 2020 vol.204.
- **Balsa, Lucía M.**; Ferraresi-Curotto, Verónica; Lavecchia, Martin J.; Echeverría, Gustavo A.; Piro, Oscar E.; García-Tojal, Javier; Pis-Diez, Reinaldo; González-Baró, Ana C.; León,

Ignacio E.

Anticancer activity of a new copper(ii) complex with a hydrazone ligand. Structural and spectroscopic characterization, computational simulations and cell mechanistic studies on 2D and 3D breast cancer cell models.

DALTON TRANSACTIONS.

2021 vol.50 n°28. p9812 – 9826

- Levín, Pedro; **Balsa, Lucía M.**; Silva, Carlos P.; Herzog, Austin E.; Vega, Andrés; Pavez, Jorge; León, Ignacio E.; Lemus, Luis.
Artificial Chemical Nuclease and Cytotoxic Activity of a Mononuclear Copper(I) Complex and a Related Binuclear Double-Stranded Helicate.
EUROPEAN JOURNAL OF INORGANIC CHEMISTRY.
2021 vol.2021 n°39. p4103 - 4112.
- **Balsa, Lucía M.**; Rodriguez, Maria R.; Parajón-Costa, Beatriz S.; González-Baró, Ana C.; Lavecchia, Martin J.; León, Ignacio E.
Anticancer Activity and Mechanism of Action Evaluation of an Acylhydrazone Cu(II) Complex toward Breast Cancer Cells, Spheroids, and Mammospheres.
CHEMMEDCHEM.
2021 vol.17 n°4.
- Fabra, David; Matesanz, Ana I.; Herrero, Jorge M.; Alvarez, Cristina; **Balsa, Lucía M.**; Leon, Ignacio E.; Quiroga, Adoracion G.
Two Different Thiosemicarbazone Tauto-Conformers Coordinate to Palladium (II). Stability and Biological Studies of the Final Complexes.
EUROPEAN JOURNAL OF INORGANIC CHEMISTRY.
2021 vol.2021 n°11. p1041 - 1049.
- Rodríguez, María R.; **Balsa, Lucía M.**; Piro, Oscar E.; Etcheverría, Gustavo A.; García-Tojal, Javier; Pis-Diez, Reinaldo; León, Ignacio E.; Parajón-Costa, Beatriz P.; González-Baró, Ana C.
Synthesis, crystal structure, spectroscopic characterization, DFT calculations and cytotoxicity assays of a new cu(II) complex with an acylhydrazone Ligand derived from thiophene.
INORGANICS.
2021 vol.9 n°2. p1 - 15.
- Burgos-López, Yacelis; **Balsa, Lucía M.**; Piro, Oscar E.; León, Ignacio E.; García-Tojal, Javier; Echeverría, Gustavo A.; González-Baró, Ana C.; Parajón-Costa, Beatriz S.
Tridentate acylhydrazone copper(II) complexes with heterocyclic bases as coligands. Synthesis, spectroscopic studies, crystal structure and cytotoxicity assays.
POLYHEDRON.
2022 vol.213 p115621
- **Balsa, Lucía M.**; Baran, Enrique J.; León, Ignacio E.
Copper complexes as antitumor agents: in vitro and in vivo evidences.
CURRENT MEDICINAL CHEMISTRY.
2023 vol.30 n°5. P 510-557
- Kljun, Jakob; Rebernik, Mihaela; **Balsa, Lucía M.**; Kladnik, Jerneja; Rapus, Uros; Trobec, Tomaz; Sepcic, Kristina; Frangez, Robert; León, Ignacio E.; Turel, Iztok.

Exploring pta Alternatives in the Development of Ruthenium–Arene Anticancer Compounds.

MOLECULES

2023 vol. 28 n°6 p 2499

- **Balsa, Lucia M.**; María R. Rodriguez, Verónica Ferraresi-Curotto, Beatriz S. Parajón-Costa, Ana C. Gonzalez-Baró, Ignacio E. León.
Finding New Molecular Targets of Two Copper(II)-Hydrazone Complexes on Triple-Negative Breast Cancer Cells Using Mass-Spectrometry-Based Quantitative Proteomics
INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR SCIENCES
2023 vol.24 7531

Congresos asistidos:

- “In vitro anticancer activity of a novel copper compound against 2D and 3D cancer cells” **Balsa L.M.**, Rodriguez M.R., Parajón-Costa B., González Baró A.C. and León I.E.
Reunión SAIC SAI SAFIS 2018
Fecha y Lugar: 14 al 17 de noviembre de 2018, Mar del Plata
Carácter de participación: Póster
- “Anticancer activity of novel copper(II) compound with a Schiff base against 2D and 3D human breast cancer models” **Balsa L.M.**, Ferraresi Curotto V., González Baró A.C. and León I.E.
Reunión Anual de Biociencia 2019
Fecha y Lugar: 13 al 16 de noviembre de 2019, Mar del Plata
Carácter de participación: Póster
- “Anticancer activity of novel copper(II) compound with an acylhydrazone ligand derived from thiophene against 2D and 3D human breast cancer models.” **Balsa L.M.**, Rodriguez M.R., Parajón-Costa B., González Baró A.C. León I.E.
VII Latin American Meeting on Biological Inorganic Chemistry
Fecha y Lugar: 6 al 9 de abril de 2021, Uruguay
Carácter de participación: Póster
- “Anticancer activity of novel copper (II) complex with a schiff-base ligand on in vitro and in vivo osteosarcoma models.” **Lucia M. Balsa**, Luisina M Solernó, Maria R. Rodriguez, Beatriz Parajón-Costa, Ana M. Gonzalez-Baró, Natasha T. Sobol, Daniel F. Alonso, Juan Garona, Ignacio E. León.
Reunión Anual de Biociencia 2021
Fecha y Lugar: 17 al 20 de noviembre de 2021, Buenos Aires
Carácter de participación: Póster
- “Evaluación de la actividad antitumoral y los mecanismos de acción de un complejo de cobre (II) con un ligando deacilhidrazona en células de cáncer de mama, esferoides y mamoesferas” **Lucia M. Balsa**, Maria R. Rodriguez, Beatriz S. Parajón-Costa, Ana C. González-Baró, Martin J. Lavecchia, Ignacio E. León
V Jornadas de Química Inorgánica Prof. Aymonino
Fecha y Lugar: 17 y 18 de octubre de 2022, La Plata

Carácter de participación: Presentación Oral

- “Finding new molecular targets of two copper(II)-hydrazones complexes on triple negative breast cancer cells using Mass Spectrometry-based Quantitative Proteomics”

Lucía M. Balsa, María R. Rodríguez, Verónica Ferraresi-Curotto, Beatriz S. Parajón-Costa, Ana C. Gonzalez-Baró, y Ignacio E. León

VIII Latin American Meeting on Biological Inorganic Chemistry

Fecha y Lugar: 25 al 29 de abril de 2023, Viña del Mar, Chile

Carácter de participación: Póster

Agradecimientos

Quiero agradecer a:

- A la Universidad Nacional de La Plata y a la Facultad de Ciencias Exactas por mi formación de posgrado.
- Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por la beca y el financiamiento aportados para las tareas de investigación.
- Al Centro de Química Inorgánica (CEQUINOR) por brindarme las instalaciones y el equipamiento empleado durante la tesis.
- A mi director Ignacio, por darme la oportunidad de trabajar con él, por su dedicación y apoyo en mi formación profesional.
- A las Dras. Beatriz Parajón Costa, Ana Cecilia González Baró, María Rosa Rodríguez, Verónica Ferraresi y Yacelis Burgos por el aporte de los complejos utilizados en este trabajo.
- A los Dres. Juan Garona y Daniel Alonso de la UNQ por su colaboración con los estudios *in vivo*.
- A Juan y Caro por su compañía y ayuda durante los primeros años del doctorado.
- A mis compañeras de laboratorio Lu, Pato y Tugce por su compañía, apoyo y risas en la oficina.
- A mis vecinas de oficina Lore, Eli, Ede, Ena y Eli J por su amistad, alegrías y almuerzos compartidos.
- A mis amigos latinoamericanos por los buenos momentos compartidos, dentro y fuera del laboratorio.
- A Flor y Vicky por ser mis hermanas-amigas, acompañándonos siempre en este camino.
- A mis papás, abuela y familia por su apoyo durante todos estos años.

ÍNDICE

1	Introducción	12
1.1	Cáncer.....	12
1.1.1	Estadísticas del cáncer.....	16
1.1.2	Cáncer y COVID-19	18
1.2	Cáncer de hueso.....	19
1.3	Cáncer de mama	21
1.4	Ciclo celular	24
1.5	Apoptosis.....	25
1.6	Metalofármacos	28
1.7	Cobre	30
1.8	Hidrazonas.....	33
2	Hipótesis.....	35
3	Objetivos	35
3.1	Objetivos generales.....	35
3.2	Objetivos específicos.....	35
4	Materiales y métodos	37
4.1	Síntesis y caracterización de los complejos de Cu(II)	37
4.2	Líneas celulares empleadas.....	37
4.2.1	MDA-MB-231.....	37
4.2.2	MCF7	37
4.2.3	MG-63.....	37
4.2.4	A549	38
4.2.5	L929	38
4.2.6	MCF10A	38
4.3	Condiciones de cultivo	39
4.4	Evaluación de la viabilidad celular mediante ensayo de MTT	39
4.5	Evaluación de la proliferación celular a través del ensayo clonogénico	40
4.6	Interacción con el ADN.....	41
4.6.1	Estudios UV-Vis.....	41
4.6.2	Estudios de fluorescencia.....	42
4.7	Ensayo de genotoxicidad. Electroforesis en gel de una única célula	43
4.8	Estrés oxidativo: Determinación de la formación de especies reactivas de oxígeno (ERO). 43	
4.9	Ensayo de inhibición de la actividad proteasomal	44

4.10	Determinación de muerte celular programada (apoptosis)	45
4.11	Proteómica	46
4.11.1	Preparación de la muestra	46
4.11.2	Identificación de proteínas y espectroscopía de masas.....	46
4.11.3	Análisis bioinformático.....	47
4.11.3.1	Análisis de enriquecimiento funcional GO	47
4.11.3.2	Análisis de interacciones proteína-proteína	48
4.12	Ensayos en cultivos 3D	48
4.12.1	Cultivo de tridimensional de esferoides multicelulares (MCS)	48
4.12.2	Ensayo de viabilidad celular con Resazurina.....	49
4.12.3	Ensayo de capacidad de formación de esferoides	50
4.12.4	Ensayo de proliferación o <i>spreading</i> celular desde esferoides.....	50
4.12.5	Evaluación de células madre cancerígenas	51
4.12.6	Formación de mamoesferas.....	51
4.13	Estudios <i>in vivo</i>	52
4.13.1	Animales.....	52
4.13.2	Progresión tumoral de xenotrasplantes.....	52
4.13.3	Estudios histopatológicos.....	53
4.13.4	Estudios toxicológicos	54
4.14	Métodos estadísticos empleados.....	54
5	Resultados	56
5.1	Complejos de cobre.....	56
5.1.1	Compuestos utilizados	56
5.1.1.1	CuHL1	56
5.1.1.2	CuHL2	57
5.1.1.3	CuHL3	57
5.1.1.4	CuL4 ₂	58
5.1.1.5	CuL5 ₂	58
5.1.1.6	ZnL5 ₂	59
5.1.1.7	VOL5 ₂	59
5.1.2	Estudio de actividad anticancerígena.....	60
5.2	Cáncer de Mama	63
5.2.1	Estudio de la actividad anticancerígena de los complejos sobre monocapa celular 63	
5.2.1.1	Viabilidad y proliferación celular.....	63
5.2.1.2	Interacción con el ADN.....	66

5.2.1.3	Genotoxicidad	71
5.2.1.4	Estrés oxidativo	73
5.2.1.5	Actividad proteosomal	75
5.2.1.6	Inducción de Apoptosis	77
5.2.1.7	Estudio de posibles blancos moleculares de CuHL1 y CuHL2.....	79
5.2.2	Estudio de la actividad anticancerígena de los complejos sobre modelos 3D....	94
5.2.2.1	Esferoides multicelulares	95
5.2.2.2	Mamoesferas.....	100
5.3	Cáncer de Hueso	104
5.3.1	Estudio de la actividad anticancerígena de los complejos sobre monocapa celular	104
5.3.1.1	Viabilidad y proliferación celular.....	104
5.3.1.2	Genotoxicidad	107
5.3.1.3	Estrés oxidativo	108
5.3.1.4	Actividad proteosomal	109
5.3.1.5	Inducción de Apoptosis	110
5.3.1.6	Estudio de posibles blancos moleculares de CuHL1 y CuHL2.....	111
5.3.2	Estudio de la actividad anticancerígena de los complejos sobre esferoides multicelulares.....	118
5.3.3	Estudio del efecto de CuHL1 en un modelo <i>in vivo</i>	121
5.3.3.1	Efecto del tratamiento con CuHL1 sobre la progresión tumoral	122
5.3.3.2	Efecto del tratamiento con CuHL1 sobre el índice mitótico tumoral	124
5.3.3.3	Efecto del tratamiento con CuHL1 sobre la necrosis tumoral	125
5.3.3.4	Evaluación de los efectos tóxicos.....	126
6	Conclusiones.....	129
6.1	Cáncer de mama	130
6.2	Cáncer de hueso.....	131
7	Anexo.....	133
7.1	Complejos de cobre.....	133
7.1.1	Viabilidad celular	133
7.2	Cáncer de mama	135
7.2.1	Viabilidad celular	135
7.2.2	Inducción de Apoptosis	137
7.2.2.1	CuHL1	137
7.2.2.2	CuHL2	139
7.2.3	Estudio de posibles blancos moleculares.....	140

7.2.3.1	Proteínas sobre-reguladas	140
7.2.3.2	Proteínas sub-reguladas.....	142
7.2.4	Células madre cancerígenas.....	144
7.2.4.1	CuHL1	144
7.2.4.2	CuHL2	145
7.3	Cáncer de hueso.....	146
7.3.1	Viabilidad celular	146
7.3.2	Inducción de Apoptosis	147
7.3.2.1	CuHL1	147
7.3.2.2	CuHL2	148
7.3.3	Estudio de posibles blancos moleculares.....	149
7.3.3.1	Proteínas sobre-reguladas	149
7.3.3.2	Proteínas sub-reguladas.....	150
8	Referencias.....	152

1 INTRODUCCIÓN

1.1 CÁNCER

El cáncer es una condición que engloba a un grupo de enfermedades que comparten como característica común la división acelerada y descontrolada de las células del organismo; también se habla de “tumores malignos” o “neoplasias malignas”.

En los tejidos normales, la proliferación celular está estrictamente controlada mediante diferentes vías de señalización, y una vez superada la etapa de crecimiento la gran mayoría de las células del organismo únicamente se dividen para reemplazar a otras células dañadas o muertas. En el cáncer, por el contrario, las células pierden el control en los procesos de reproducción y crecimiento, por lo que se reproducen de forma anormal e incontrolada, provocando la aparición de un tumor. Esta alteración del crecimiento celular está desencadenada por mutaciones adquiridas que afectan en un inicio a una sola célula y luego a su progenie clónica. Estas mutaciones proporcionan a las células neoplásicas una ventaja por sobre las células no neoplásicas, para su supervivencia y crecimiento, que permiten su proliferación excesiva e independiente de las señales fisiológicas de crecimiento.

Basándose en las diferencias en los patrones de crecimiento los tumores pueden clasificarse en benignos y malignos. Los tumores benignos presentan un aspecto macroscópico y microscópico relativamente inocuo, es decir, se encuentran localizados, sin propagarse hacia otros tejidos y es posible realizar una extirpación quirúrgica local. Un tumor maligno, en cambio, es el que tiene la capacidad de invadir y destruir las estructuras adyacentes y propagarse hacia sitios remotos (metastatizar). El crecimiento de los tumores malignos se acompaña de una infiltración, invasión y destrucción del tejido circundante. Un tumor se considera canceroso sólo si es maligno, es decir, si sus células tienen la capacidad de invadir el tejido circundante.

Además, los tumores malignos y benignos se diferencian por una serie de características histológicas y anatómicas. Una de ellas es el grado de diferenciación: los tumores benignos están compuestos por células bien diferenciadas, por lo que en general

conservan una función similar a las células normales. Mientras que los tumores malignos están compuestos por células poco diferenciadas, o anaplasias, lo que permite que adquieran funciones nuevas e imprevistas. Además, los tumores malignos se caracterizan por una abundancia de células en mitosis, debido a su gran actividad proliferativa, con figuras mitóticas atípicas con morfología anómala de los núcleos, husos multipolares y pérdida de polaridad.

Aunque hay una gran variabilidad entre las células tumorales, existen ciertas características comunes a las células cancerígenas que las diferencian de las células normales que se consideran, según Hanahan y Weinberg, los “*Hallmarks*” o rasgos característicos del cáncer [1]. Originalmente consistían de 8 características: pérdida de sensibilidad frente a señales que detienen el crecimiento, autosuficiencia en señales de proliferación, evasión de la apoptosis, potencial replicativo ilimitado, angiogénesis sostenida, invasión de tejidos y metástasis, inestabilidad genómica y promoción de la inflamación. En 2022 Hanahan publicó una actualización en la que se agregan 6 *hallmarks* nuevos: desregulación del metabolismo celular, evasión de la respuesta inmune, senescencia celular, microbioma polimórfico, reprogramación epigenética no mutagénica y plasticidad fenotípica [2]. Éstas se encuentran resumidas en la figura 1.



Figura 1. Características del cáncer. Imagen adaptada de Hanahan 2022 [2]

Se considera que el tumor primario deriva de una sola célula normal que sufre alteraciones irreversibles de los genes relacionados con el control del ciclo celular y la muerte celular. Este cambio es heredado a las siguientes generaciones, que presentarán los mismos fallos y el mismo comportamiento tumoral. De esta forma, el tumor crecerá de forma descontrolada mediante clones de la primera célula dañada [3]. Esta secuencia de eventos que conduce a la aparición de una neoplasia maligna se denomina carcinogénesis. El inicio de un cáncer requiere que en una misma célula se produzcan sucesos genéticos múltiples, una acumulación gradual de mutaciones, que cooperen entre sí para promover el crecimiento de la célula cancerosa. De esta forma, un leve desorden inicial del comportamiento celular evoluciona de manera gradual hasta un cáncer destructivo. En general, las células cancerígenas tienen mutados genes vitales, como oncogenes, genes supresores de tumores, los cuales alteran el ciclo celular, y producen una proliferación celular anormal, no controlada [4]. Estas alteraciones genéticas son el resultado de la interacción entre factores genéticos y agentes externos [5]:

- Carcinógenos físicos, como las radiaciones ultravioletas e ionizantes

- Carcinógenos químicos, como el amianto, los componentes del humo de tabaco, las aflatoxinas (contaminantes de los alimentos) y el arsénico (contaminante del agua de bebida)
- Carcinógenos biológicos, como determinados virus, bacterias y parásitos.

Otros factores de riesgo incluyen el estilo de vida, dieta, ocupación, enfermedades inflamatorias crónicas, concentraciones elevadas de hormonas, entre otras.

Existen más de 200 tipos de cáncer que pueden ser clasificados desde un punto de vista histológico, es decir, de acuerdo con el tejido y tipo celular a partir del cual se originan. Encontramos las siguientes categorías principales:

- 1) Carcinoma: hace referencia a una neoplasia maligna originadas a partir de células epiteliales, las cuales recubren las partes internas y externas del cuerpo. Son el tipo más común de cáncer, representando del 80 al 90% de todos los casos de cáncer. Muchos de ellos afectan a órganos o glándulas que son capaces de secretar, como la mama, pulmón, colon, próstata o vejiga. Estos son divididos en 2 subtipos principales según el tipo de célula epitelial donde se inician:
 - Adenocarcinoma: se inicia en las células epiteliales que producen líquido o moco. Generalmente ocurren en las membranas mucosas y tejidos glandulares. La mayoría de los cánceres de mama, colon y próstata son adenocarcinomas.
 - Carcinoma de células basales: se forma en la capa inferior o de base de la epidermis.
 - Carcinoma de células escamosas: se origina en las células escamosas, células epiteliales que están justo debajo de la superficie externa de la piel. También recubren muchos órganos, como estómago, intestinos, pulmón, vejiga y riñones.
 - Carcinoma de células transicionales: se forma en el epitelio transicional o urotelio. Se encuentra en el revestimiento de la vejiga, los uréteres y la pelvis renal. Algunos cánceres de vejiga, uréter y riñón son carcinomas de células transicionales.

- 2) Sarcoma: se origina en el tejido conjuntivo presente en los huesos, cartílagos, nervios, vasos sanguíneos, músculos y tejido adiposo. El sarcoma más común es el cáncer de hueso u osteosarcoma. Otros tipos comunes de sarcoma de tejido blando son: leiomioma, sarcoma de Kaposi, histiocitoma fibroso maligno, liposarcoma y dermatofibrosarcoma protuberante.
- 3) Mieloma: se origina en las células plasmáticas de la médula ósea. Estas células plasmáticas anormales, denominadas células de mieloma, se acumulan en la médula ósea y forman tumores en los huesos de todo el cuerpo.
- 4) Leucemia: son neoplasias de la médula ósea, originadas en células del sistema hematopoyético. Generalmente está asociada a la sobreproducción de glóbulos blancos inmaduros. Se clasifican en linfocítica o mieloide, según el tipo de célula de origen; y en aguda y crónica, según el grado de maduración de las células leucémicas.
- 5) Linfoma: se desarrolla en las glándulas o ganglios del sistema linfático. Los linfocitos anormales se acumulan en los ganglios y vasos linfáticos, y en otros órganos del cuerpo. Son clasificados en 2 subcategorías: linfomas de Hodgkin y linfomas no Hodgkin.

1.1.1 Estadísticas del cáncer

El cáncer se encuentra dentro de las principales causas de muerte a nivel mundial. En 2020 se reportaron 19,3 millones de casos nuevos y 9,9 millones de muertes. Para el año 2040, según el Observatorio Global del Cáncer (GCO: *Global Cancer Observatory*), se espera que el número de casos por año aumente a 29,5 millones y el número de muertes a 16,4 millones [6].

De acuerdo con el Instituto Nacional del Cáncer (INC), Argentina presenta una tasa de incidencia de 212,4 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 181,1 a 248.3 por 100000 habitantes), ubicándola a su vez en el quinto lugar en Latinoamérica. Esta estimación corresponde a más de 126000 casos nuevos de cáncer en ambos sexos por año, con una distribución de 47,3% de casos en hombres y 52,7% en mujeres.

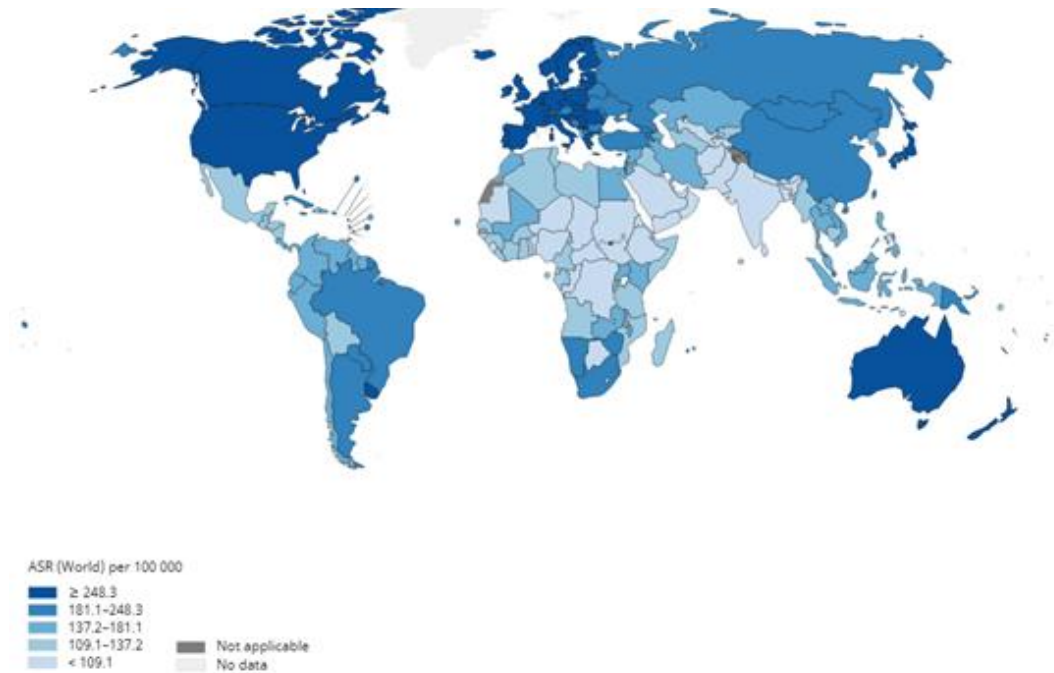


Figura 2. Estimaciones de incidencia de cáncer a nivel mundial, 2020. Ambos sexos, todos los cánceres, excluyendo piel no melanoma. Tasas estandarizadas por edad según población mundial por 100.000 habitantes. Fuente INC (Observatorio Global del Cáncer. GLOBOCAN, 2020)

En cuanto a los tipos de cáncer más frecuentes en Argentina, el cáncer de mama fue el de mayor magnitud en el año 2020, con 22024 casos, representando el 16,8% de todos los casos. En segundo lugar, se ubica el cáncer colorrectal, con 15895 casos nuevos, que corresponde al 12,1% del total y, en tercer lugar, el cáncer de pulmón, con 12110 casos nuevos, que representan el 9,3% del total de casos.

Respecto de la distribución por sexos, en los varones la mayor incidencia estuvo dada por el cáncer de próstata, con una incidencia de 42,0 casos cada 100000 varones. En las mujeres la mayor incidencia estuvo dada por el cáncer de mama, con una incidencia de 73,1 casos cada 100000 mujeres. Para ambos sexos, el segundo tipo de cáncer más común es el color rectal, con una incidencia de 31,0 para el hombre y de 20,6 para las mujeres.

En cuanto a la mortalidad, en 2020 se registraron 70074 fallecimientos por tumores en la Argentina, colocándolo dentro de las principales causas de muerte. El tipo de cancer con mayor mortalidad fue el de mama (18,9 muertes cada 100000 habitantes), seguido por el cáncer de pulmón (16,8 muertes cada 100000 habitantes) y por el cáncer colorrectal (12,6 muertes cada 100000 habitantes).

El cáncer de pulmón determinó la mayor mortalidad (21,26/100.000 varones), seguido por el cáncer colorrectal (13,59/100.000), próstata (11,10/100.000), páncreas (7,59/100.000) y estómago (6,60/100.000).

1.1.2 Cáncer y COVID-19

A fines del 2019 se registraron los primeros casos de COVID-19, dando lugar a una pandemia con más de 511 millones de casos y 6 millones de muertes a nivel mundial. Los servicios de salud en todo el mundo han sido afectados por esta pandemia: sistemas de atención médica colapsados, escasez de recursos y personal médico. Por esta razón, un gran número de procedimientos médicos, cirugías electivas o no urgentes y consultas médicas han sido canceladas o reprogramadas.

Los pacientes oncológicos tienen un mayor riesgo de adquirir COVID-19 y un peor pronóstico, incluyendo formas graves de la enfermedad que requieren ingreso a cuidados intensivos y un aumento de la mortalidad. Estos riesgos llevaron a los oncólogos a realizar modificaciones en los tratamientos, de modo de disminuir la exposición de los pacientes oncológicos a COVID-19. Se realizaron cambios en la intensidad y duración de las terapias para evitar posibles efectos adversos y limitar posibles exposiciones a COVID-19. Encuestas a centros oncológicos alrededor del mundo mostraron que el 44% de las cirugías oncológicas, el 25% de las sesiones de quimioterapia y el 14% de los turnos de radioterapia fueron cancelados o reprogramados durante la pandemia [7][8].

Por otro lado, las medidas de aislamiento social impuestas por los diferentes países para reducir el riesgo de transmisión han afectado los programas preventivos de detección. Ha habido un marcado descenso a nivel mundial en el diagnóstico de cáncer y estudios preventivos como biopsias, colonoscopías, endoscopías, mamografías, Pap y colposcopia. En Argentina en el 2020 se ha reportado un descenso del 80% en la cantidad de estudios preventivos realizados [9]. Retrasos en la búsqueda preventiva de síntomas llevan a diagnósticos en etapas avanzadas de la enfermedad, lo cual demora su tratamiento y produce un aumento en la mortalidad a largo plazo.

1.2 CÁNCER DE HUESO

Dentro de los tumores óseos podemos encontrar: tumores primarios de hueso, formados a partir de tejido óseo que pueden ser tanto malignos como benignos, y tumores secundarios o metastásicos, formados de células cancerosas provenientes de otra parte del cuerpo que se extendieron a los huesos. El cáncer de hueso primario es raro, representa menos del 1 % de todos los cánceres nuevos diagnosticados, con una incidencia anual de solamente 3 a 4 casos por millón. Incluye al osteosarcoma, sarcoma de Ewing y condrosarcoma. El osteosarcoma (OSA) es el cáncer de hueso primario más común, principalmente en niños y adolescentes. Se encuentra como el quinto cáncer de mayor incidencia y segundo con mayor mortalidad en los adolescentes a nivel mundial [10].

En la Argentina, de acuerdo al Registro Oncopediátrico Hospitalario Argentino, los tumores óseos se encuentran en octavo lugar en cantidad de casos registrados entre los años 2000 y 2016, de los cuales el OSA representa la mayoría de estos tumores. La tasa de incidencia del OSA es de 3,3 por millón de niños menores de 15 años, similar a la reportada a nivel mundial [11].

El origen certero del OSA se desconoce, pero se cree que se origina en células mesenquimales primitivas malignas, ya que posee en su histología tanto componentes osteoblásticos como fibroblásticos y condroblásticos. Generalmente se desarrolla en los huesos largos de las extremidades como el fémur distal (42% de los casos), la tibia proximal (19%) y el húmero proximal (10%). Otras locaciones menos recurrentes son el cráneo y mandíbula (8%) y la pelvis (8%). El pico de incidencia en la adolescencia y la predilección por los sitios de crecimiento activo, como los huesos largos de las extremidades, lleva a relacionar al OSA con los periodos de crecimiento óseo acelerado, en los cuales las células presentan mayor vulnerabilidad a las mutaciones [12].

El OSA es un cáncer altamente metastásico. Al momento del diagnóstico, alrededor del 15-20% de los pacientes presentan compromiso metastásico. El 80-90% de los pacientes restantes puede suponerse que poseen micrometástasis todavía no detectables. Es la principal complicación que se presenta en el OSA, que generalmente termina siendo

fatal: entre los pacientes que desarrollan metástasis, menos de 1 de cada 5 sobrevive [13]. Los tumores primarios pueden diseminarse de forma regional, dentro del mismo hueso o a otro hueso a través de una articulación. También puede generar metástasis sistémica, principalmente en pulmones a través del sistema circulatorio, y en segundo lugar en huesos de otras extremidades [14].

Actualmente, la estrategia de tratamiento para el OSA comprende un enfoque multimodal. En primer lugar, se utiliza quimioterapia neoadyuvante, con el objetivo de producir necrosis tumoral y disminuir el tamaño del tumor primario, así como de reducir las lesiones metastásicas, en caso de presentarse. En segundo lugar, se realiza una cirugía para remover las lesiones tumorales primarias y las lesiones metastásicas evidentes. Por último, se administra quimioterapia adyuvante postcirugía (Meazza 2016). Los protocolos de quimioterapia estándar, tanto neoadyuvante como adyuvante, incluyen combinaciones de las siguientes drogas: dosis altas de metotrexato, doxorubicina, ciclofosfamida, cisplatino, ifosfamida, etopósido y carboplatino [15].

La incorporación de la quimioterapia neoadyuvante entre los años 1970 y 1980 mejoró drásticamente la expectativa de vida de los pacientes. La tasa de supervivencia global a 5 años pasó del 20% a aumentar hasta el 70% para pacientes con tumores localizados. Si, en cambio, se trata de pacientes con metástasis o enfermedad la tasa de supervivencia global a 5 años disminuye al 28% [12]. En los países de bajos recursos, como Latinoamérica, sin embargo, estos valores son significativamente menores: en la Argentina la tasa de supervivencia a 5 años de pacientes con OSA localizado es de 44.1%, mientras que para pacientes con metástasis es de 22% [16]. Esta diferencia en la tasa de supervivencia entre la Argentina y los países desarrollados puede deberse a múltiples factores, posiblemente asociadas a una disparidad importante entre los sistemas de salud. Principalmente se encuentran dificultades en la capacidad de realizar diagnósticos tempranos, biopsias y confirmación del diagnóstico. Además, en la Argentina hay una falta de estandarización de las prácticas de diagnóstico y tratamiento que afectan la supervivencia de los pacientes [16].

En los últimos años se han realizado múltiples esfuerzos para desarrollar nuevos agentes terapéuticos que contribuyan a mejorar el pronóstico de la enfermedad, ya que la

modalidad de los tratamientos y el pronóstico poco favorable se han mantenido casi inalterados después de la incorporación de la terapia neoadyuvante. Lamentablemente, los ensayos clínicos de fase II con terapias dirigidas basadas en anticuerpos monoclonales o pequeños inhibidores de blancos moleculares han dado resultados desfavorables, a pesar de tener resultados prometedores en las etapas preclínicas [12].

La baja efectividad de los esquemas de tratamiento de quimioterapia actualmente disponibles y el hecho de que las nuevas terapias no arrojaron resultados prometedores en la etapa clínica generan un contexto hostil para los pacientes con OSA, especialmente en los países con bajos recursos, donde el pronóstico es desalentador. En consecuencia, surge la necesidad de encontrar nuevas alternativas terapéuticas que mejoren el manejo de esta enfermedad agresiva.

1.3 CÁNCER DE MAMA

El término "cáncer de mama" hace referencia a un tumor maligno que se ha desarrollado a partir de células mamarias. La mayoría de los tumores mamarios son benignos, no cancerígenos. Los tumores de mama benignos son crecimientos anormales, debido a formaciones fibroquísticas, pero que no se extienden por fuera del tejido mamario. Los tumores malignos se originan, con mayor frecuencia, en las células de los lobulillos, las glándulas productoras de leche, o en los conductos. También se pueden originar, pero con menor frecuencia, en los tejidos estromales, los cuales incluyen a los tejidos conjuntivos grasos y fibrosos de la mama. El cáncer de mama puede invadir los vasos sanguíneos locales y generar metástasis en órganos distantes como hueso, pleura, pulmón, hígado, etc. Según su diagnóstico histológico, el tipo de cáncer de mama más común es el carcinoma ductal invasivo, representando un 50-75% de los pacientes, seguido por el carcinoma lobular invasivo, que representa un 5-15% de los pacientes. El resto de los pacientes presentan otras histologías más raras, como carcinomas lobulares y ductales *in situ*, no invasivos, y carcinomas mixtos ductal/lobular entre otros [17].

El cáncer de mama se clasifica también según la presencia de ciertos marcadores moleculares: receptores hormonales (receptor de estrógenos, RE α , y receptor de

progesterona, RP) y el factor de crecimiento epidermal 2 (ERBB2 o HER2). A partir del análisis de estos marcadores el cáncer de mama se clasifica de la siguiente manera:

- Receptor hormonal positivo (RH+): son el tipo de cáncer de mama más común, comprendiendo el 60-70% de los tumores. Se caracterizan por una expresión alta de RE α , RP y otros genes asociados a la activación de RE α . RE α es un factor de transcripción que, cuando es activado por el estrógeno, activa las vías oncogénicas de crecimiento en las células de cáncer de mama. Suelen tener un crecimiento más lento que los cánceres RH- y un mejor pronóstico a corto plazo. Este grupo de tumores está formado por los tumores luminales, ellos son:
 - Luminal A: es el más frecuente, 67% de los casos. Tiene alta expresión del gen de RE α y/o de RP.
 - Luminal B: tiene una mayor expresión de genes asociados a la proliferación y el ciclo celular, como Ki-67, y una menor expresión de RP. Son considerados más agresivos que los Luminal A, ya que sus células tienden a crecer más rápido.
- HER2+: representan del 12% al 20% de todos los cánceres de mama. Se caracterizan por una sobreexpresión del oncogén HER2 y bajos niveles de expresión de los receptores hormonales. HER2 codifica para un receptor de tirosin-quinasa transmembrana que, tras su activación por señales extracelulares, media la proliferación celular y la supervivencia. Estas características generan un crecimiento tumoral más agresivo y un peor pronóstico.
- Triple negativo o subtipo basal (TNBC): corresponde a un 15% aproximadamente de todos los tumores, es caracterizado por la falta de expresión de RE α , RP y HER2. Es el subtipo más agresivo, se da mayoritariamente en mujeres menores a 40 años, con tumores de mayor grado y un mayor riesgo de recurrencia y muerte luego de 3-5 años post-diagnóstico.

El tratamiento del cáncer de mama depende de varios factores, incluyendo el tipo de cáncer, el tamaño del tumor, su propagación y condiciones preexistentes. Para el cáncer de mama no metastásico el objetivo principal del tratamiento es erradicar el tumor y

prevenir recurrencias metastásicas. La mayoría de los pacientes tienen una cirugía para remover el tumor de la mama y nódulos linfáticos, la cual se acompaña con terapia sistémica, que puede ser neoadyuvante, adyuvante o ambas. El tratamiento aplicado depende, en gran parte, del tipo de cáncer de mama que presente el paciente. En el cáncer de mama RH+ se utilizan bloqueadores de los receptores de estrógeno, como el tamoxifeno, e inhibidores de la aromatasas, los cuales disminuyen los niveles de estrógeno. Este tipo de terapia hormonal contrarresta el crecimiento tumoral promovido por el estrógeno. En cuanto al cáncer de mama HER2+, se utiliza fundamentalmente terapia dirigida (inmunoterapia) contra este receptor. Se han desarrollado varios medicamentos que atacan a esta proteína como son los anticuerpos monoclonales (Trastuzumab, Pertuzumab, Ado-trastuzumab) e inhibidores de la actividad quinasa (Lapatinib, Neratinib). Se pueden administrar de forma conjunta con quimioterapia y terapia hormonal.

Cuando se trata del cáncer de mama triple negativo las terapias hormonales y dirigidas no son efectivas, ya que no presentan las moléculas blanco de estos tratamientos. Es por esto que el principal tratamiento para TNBC es la quimioterapia. Las drogas quimioterapéuticas más usadas incluyen antraciclinas (doxorrubicina y epirubicina), taxanos (paclitaxel y docetaxel) y capecitabina entre otros. También se utilizan quimioterápicos de platino, como el carboplatino. Sin embargo, no hay una guía de tratamiento estandarizada para este tipo de cáncer de mama. Además, este tratamiento convencional con quimioterapia tiene una baja eficacia; presenta importantes efectos adversos y una alta tasa de recurrencias metastásicas. Es por esto que es necesario el desarrollo de nuevas estrategias para el tratamiento de TNBC.

El cáncer de mama es el tipo de cáncer de mayor incidencia a nivel mundial, con una tasa de 47,8 casos cada 100000 mujeres en el 2020. La Argentina pertenece a los países con una tasa de incidencia alta (más de 69,2 cada 100.000 habitantes), lo que la coloca en el tercer puesto de tasas de incidencia en Sudamérica. En cuanto a la mortalidad por cáncer de mama, la Argentina tiene una tasa de mortalidad media-alta con 16,6-19,4 muertes cada 100.000 habitantes. Sin embargo, se ha registrado un descenso sostenido

de la mortalidad por cáncer de mama a lo largo del período 2002–2019, a un ritmo de -1,03 % anual [18].

1.4 CICLO CELULAR

Las células proliferan sosteniendo el crecimiento del organismo, manteniendo los tejidos y reemplazando células dañadas. El ciclo celular comprende una serie de eventos en los cuales los componentes celulares son duplicados y luego divididos en dos células hijas con contenido genético idéntico. La mayoría de las células en el cuerpo humano no proliferan, se encuentran fuera del ciclo celular, en un estado de diferenciación terminal, como las neuronas y miocitos, o en un estado quiescente, como las células gliales o los hepatocitos. Por otro lado, una porción minoritaria de células se encuentra activamente dentro del ciclo, proliferando. Éstas se encuentran principalmente en los tejidos renovables, como el tejido epitelial y la médula ósea.

El ciclo celular tiene cuatro fases: las fases G_1 , S y G_2 , que componen la interfase, y la fase M, donde la célula se divide. En la fase G_1 la célula crece, sintetiza proteínas y ARN. En esta etapa la célula es sensible a señales de crecimiento tanto positivas como negativas. Si las condiciones del entorno son las adecuadas, el ciclo avanza a la fase S, donde ocurre la replicación del ADN, y finalmente ocurre la fase G_2 , en la cual continúa el crecimiento y la célula se prepara para la mitosis. Por último, en la fase M, se da la división celular. Esta fase se divide a su vez en varias etapas: profase, prometafase, metafase, anafase y telofase. Finalmente, el ciclo celular cierra con la producción de la citocinesis, que da como resultado las dos células hijas.

La progresión a través del ciclo celular es impulsada por la familia de quinasas dependientes de ciclinas (CDKs) y sus reguladoras, las ciclinas. Las CDKs fosforilan sus sustratos blancos para promover la síntesis del ADN y la progresión mitótica. La cantidad de CDKs se mantiene constante a lo largo del ciclo, pero sólo se encuentran catalíticamente activas cuando forma parte del complejo CDK-ciclina con su respectiva ciclina. La progresión a través de cada fase del ciclo celular y la transición de una fase a la siguiente se encuentran monitoreados por mecanismos sensores, llamados puntos de

control, que mantienen el orden correcto de los eventos. Si se detecta un evento del ciclo irregular o incompleto, como por ejemplo una falla en la replicación del ADN o en la segregación de los cromosomas, se envían señales que llevan al arresto del ciclo celular hasta que el problema se resuelva. Las proteínas efectoras, encargadas de este arresto, se denominan inhibidores de CDKS (CDKIs).

En el organismo existe un equilibrio entre la proliferación y la muerte celular, apoptosis, que regula la población celular de cada tejido. Si se produce una desregulación de la maquinaria del ciclo celular este equilibrio se rompe, la célula es capaz de repetir de manera indefinida el ciclo y se produce una proliferación descontrolada que termina por generar una célula tumoral.

Muchas mutaciones oncogénicas ejercen sus efectos sobre los componentes de la vía de señalización, forzando la progresión del ciclo celular en lugar de los controles normalmente regulados [19]. Por ejemplo, componentes de la vía Ciclina D1/CDK4/6-RB (permite la transición de G_0/G_1 a la fase S) están comúnmente mutados en procesos cancerígenos [20]. Otras mutaciones, por ejemplo, alteran la respuesta ante la presencia del ADN dañado y los mecanismos de control, permitiendo una consolidación de daño genómico [19]. El factor de transcripción nuclear p53 es activado frente a señales de daño en el ADN, lo que lleva al arresto del ciclo celular para permitir la reparación de ADN o para inducir apoptosis (dependiendo del nivel de daño en el ADN) previniendo la propagación de células con ADN dañado y manteniendo la integridad genómica. Científicos demostraron que aproximadamente el 50% de los cánceres tiene pérdida de función de p53 por mutaciones en el gen, sugiriendo que este factor es un supresor de tumores. Este p53 mutado, además de ser pro tumorigénico, también genera quimio resistencia [21].

1.5 APOPTOSIS

La apoptosis es un proceso de muerte celular programada que interviene en procesos fisiológicos, necesarios para mantener la homeostasis celular, como la embriogénesis, la regulación del sistema inmunitario y la renovación tisular, entre otros. Trastornos en

la regulación de la apoptosis pueden producir diversas enfermedades autoinmunes y neurodegenerativas. A su vez, su desregulación puede ser una causa del desarrollo de diversos tumores, ya que la apoptosis participa en la eliminación de células defectuosas.

Durante la apoptosis ocurren ciertos cambios morfológicos característicos. En primer lugar, se produce la condensación de la cromatina, la desintegración nucleolar, el encogimiento del núcleo y la condensación del citoplasma, acompañada de redondeo celular, pérdida de su volumen (picnosis), y la retracción de pseudópodos. La integridad de la membrana plasmática se conserva, pero se forman estructuras tipo “burbuja” en la misma. En las etapas tardías de la apoptosis se produce la rotura internucleosomal del ADN y se forman cuerpos apoptóticos (fragmentos nucleares recubiertos de membrana), que son fagocitados por células del sistema inmune, sin la generación de una reacción inflamatoria.

A su vez, durante este proceso ocurren una serie de cambios bioquímicos. Estos eventos incluyen activación de caspasas, liberación de citocromo C de las mitocondrias, clivaje de la poli ADP ribosa polimerasa y fragmentación internucleosomal del ADN en múltiples oligonucleosomas de 180-200 pares de bases por endonucleasas [22]. Un evento temprano importante del proceso de apoptosis es la externalización de la fosfatidilserina a la parte externa de la membrana plasmática. Esto permite el reconocimiento de las células muertas por los macrófagos, resultando en la fagocitosis, sin liberar componentes proinflamatorios [22].

El proceso de apoptosis puede ocurrir mediante dos mecanismos: la vía extrínseca o la vía intrínseca. En ambos mecanismos 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. Estas enzimas están presentes como zimógenos denominados pro-caspasas que, frente a estímulos específicos, son clivadas generando su forma activa.

La vía extrínseca, es iniciada por un estímulo externo que involucra a la familia de receptores de muerte. La unión de ligandos de la familia TNF (FasL y TRAIL) a los receptores de muerte (Fas, TNFR1, etc.) en la membrana plasmática, resulta en la

formación del complejo de inducción de muerte (DISC). DISC a su vez, inicia la activación de la pro-caspasa 8. La caspasa 8 es una caspasa iniciadora, la cual activa o amplifica la activación de la caspasa 3. Esto permite la salida de citocromo C de la mitocondria, la formación del apoptosoma, y la activación de la caspasa 9.

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

Ambas vías convergen en la activación de la caspasa 3, la cual cliva el inhibidor de la desoxirribonucleasa, la cual es responsable de la apoptosis nuclear. Luego induce el clivaje de quinasas y proteínas del citoesqueleto y de reparación del ADN. También afecta el ciclo celular y vías de señalización, las cuales contribuyen a los cambios morfológicos típicos durante el proceso de apoptosis. En ambas vías, los eventos tardíos de la apoptosis ocurren luego de la activación de las caspasas y se bloquea el acceso de las enzimas que reparan el ADN, provocando apoptosis [22].

La apoptosis es un proceso altamente regulado ya que su inducción inapropiada tiene implicancias patológicas y ha sido asociada a ciertas patologías, como enfermedades neurodegenerativas, rechazo de trasplantes, y cáncer, entre otras. En cuanto al cáncer, la evasión de la muerte celular, mediante la reducción del proceso de apoptosis o su resistencia, juega un rol clave en la carcinogénesis. Generalmente, los mecanismos mediante los cuales se produce la evasión de la apoptosis son: 1) la alteración del balance entre proteínas pro y anti-apoptóticas, 2) reducción en la función de las caspasas, 3) disrupción de la señalización a través del receptor de muerte, en consecuencia no inicia la cascada de señalización y 4) disminución en la expresión de receptores, relacionado con los mecanismos de resistencia adquirida a drogas [22].

1.6 METALOFÁRMACOS

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 modifica las propiedades físicas y químicas de cada una de sus partes, e impacta en factores como la estabilidad, la solubilidad y las propiedades biológicas de las partes que lo componen.

Como consecuencia del gran avance de la química bioinorgánica, los complejos tienen interesantes aplicaciones en varios campos, como en la catálisis y la ciencia de los materiales, en procesos de descontaminación del medio ambiente, y también una gran aplicación en la medicina y la farmacología. Los metalofármacos tienen variadas aplicaciones en el tratamiento de ciertas enfermedades, como antiartrítico (compuestos de oro), tratamiento para úlceras (compuestos de bismuto), inflamación, enfermedades neurodegenerativas, metales con actividad insulinoimimética (compuestos de vanadio), vasodilatadores (compuestos con hierro con nitroprusiato de sodio) y como agentes antimicrobianos y antitumorales [23][24].

El descubrimiento de la actividad anti proliferativa del cisplatino (CisPt), por Barnett Rosenberg y colaboradores en 1968, fue lo que disparó el interés por las terapias con metales. Desde entonces, el descubrimiento de los iones metálicos con propiedades medicinales se ha expandido a un amplio rango en terapias y diagnóstico [25][23].

El CisPt 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, cuello, esófago, cáncer de pulmón de células no pequeñas, mesotelioma, cáncer cerebral y neuroblastoma. La eficacia de su acción es atribuida a su hidrólisis una vez en el interior celular y su subsecuente unión a las bases nitrogenadas del ADN, que actúan como ligandos nucleofílicos. La formación de aductos, producto de la interacción con las guaninas y adeninas, bloquean la replicación y la transcripción del ADN, desencadenando una cascada de señalización de apoptosis que lleva, finalmente, a la muerte celular [25][23].

A pesar de su éxito, el CisPt tiene varias desventajas que implican graves efectos tóxicos como: nefrotoxicidad, neurotoxicidad y emetogenicidad. Estos efectos tóxicos, así como la escasa solubilidad en solución fisiológica limitan la dosis que puede ser administrada a los pacientes. Asimismo, su aplicabilidad está restringida a un rango estrecho de tumores, algunos de los cuales poseen resistencia natural al CisPt, mientras que otros desarrollan la resistencia luego del tratamiento inicial.

Para superar las limitaciones del uso del CisPt se diseñaron y sintetizaron nuevos complejos de Pt, orientándose a disminuir los efectos tóxicos colaterales, aumentar la solubilidad en agua, de forma de permitir otras vías de administración como la administración oral, y obtener una mayor actividad y un amplio espectro de acción. Esto ha dado origen a la “segunda generación” de complejos antitumorales basados en platino. En la figura 3 se muestran algunos de los complejos de platino que se han abierto paso como agentes quimioterapéuticos.

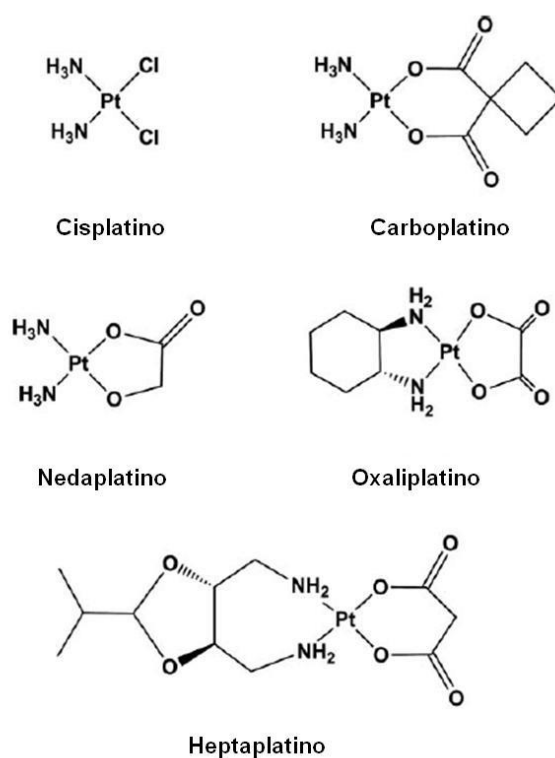


Figura 3. Estructura de diversos complejos de Pt con actividad antitumoral

De todos ellos, sólo el carboplatino y oxaliplatino han alcanzado aprobación a nivel mundial y están siendo utilizados rutinariamente en la práctica clínica. El carboplatino es menos tóxico que el CisPt, pero lamentablemente sólo muestra actividad frente a los mismos tumores que éste ya que forma los mismos aductos de ADN y también debe ser administrado en forma intravenosa. Ciertos avances en el área de resistencia se han obtenido con la utilización de oxaliplatino, el cual es eficaz contra el cáncer de colon metastásico resistente al CisPt debido a que forma diferentes aductos con el ADN, evitando la unión de proteínas reparadoras al mismo.

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

1.7 COBRE

El cobre es uno de los metales más abundantes en todas las formas de vida superiores. En los organismos vivos, se encuentra presente en dos estados de oxidación estables, Cu(I) y Cu(II), con un par redox adaptable al rango de potencial redox biológico. Por lo tanto, el uso más común del cobre es en transferencia electrónica, y se encuentra asociado a enzimas oxidativas y la captura energética. Además, el cobre juega un papel en otras funciones no enzimáticas como formación de tejido conectivo, metabolismo del hierro, angiogénesis, respuesta a la hipoxia, señalización intracelular, mantenimiento del balance redox a nivel intracelular y neuromodulación, entre otros.

Debido a la importancia del cobre y su potencial toxicidad, el transporte y almacenamiento de este metal está altamente regulado. 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. En la Figura 4 se representa de forma esquemática el movimiento intracelular del cobre.

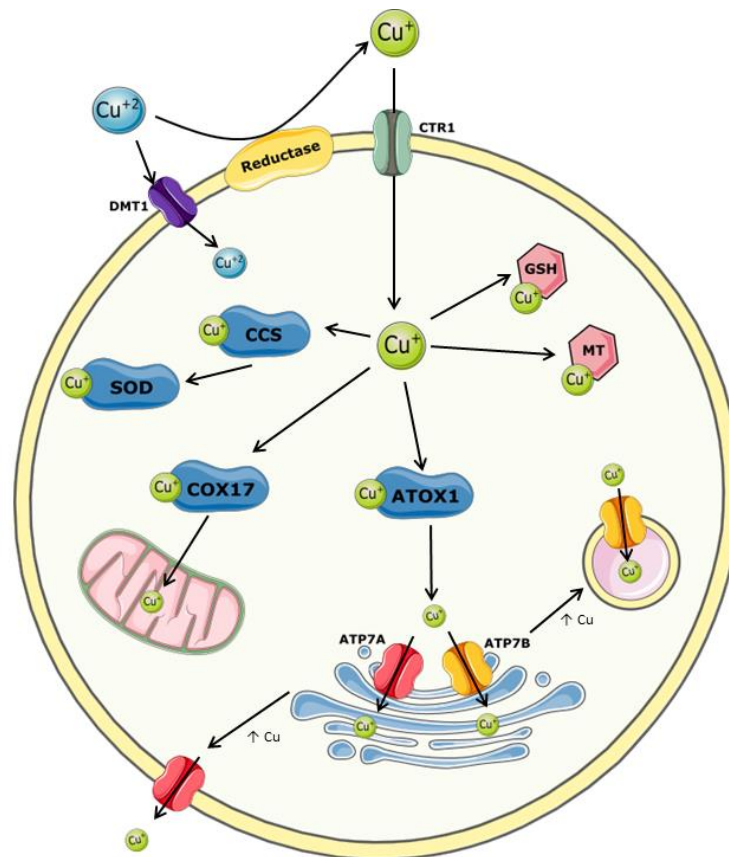


Figura 4. Representación esquemática del sistema de homeostasis y tráfico intracelular del cobre.

Debido a su relevancia biológica, numerosos complejos de cobre han sido extensamente sintetizados e investigados con diferentes propiedades farmacológicas dentro de las cuales se destacan: antiinflamatorios, anticonvulsivos, analgésica, antimicrobiana, anticancerígenas, esta última debido a su elevada actividad antitumoral y ventajas en relación a otros metalofármacos [26].

Los complejos de cobre han demostrado tener gran eficacia terapéutica en el tratamiento de diferentes tipos de cáncer en estudios preclínicos [27]. Los mecanismos

específicos de acción y los objetivos moleculares de los complejos de cobre anticancerígenos no se han caracterizado por completo. Sin embargo, se han propuesto varios mecanismos de acción resumidos en la Figura 5.

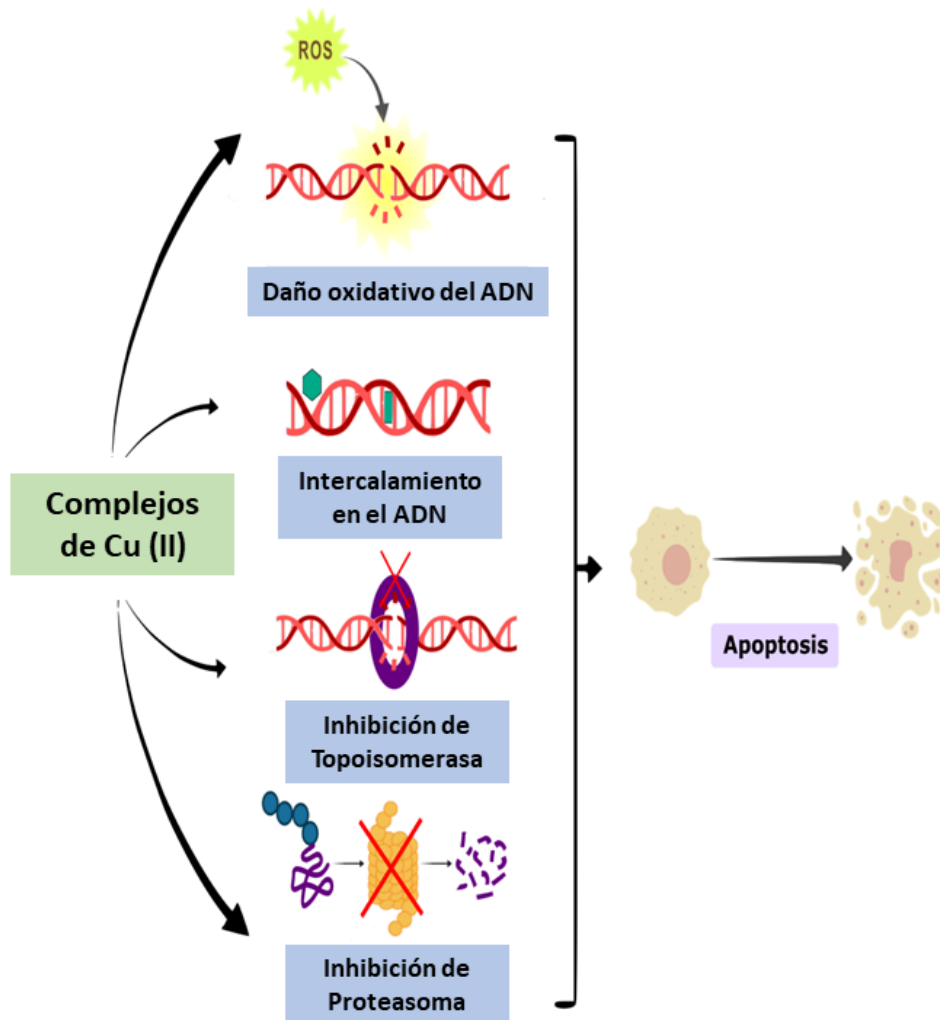


Figura 5. Representación esquemática de los blancos moleculares implicados en la actividad antitumoral de los complejos de cobre.

Se ha demostrado que el cobre tiene la capacidad de unirse al ADN con gran afinidad. Los complejos de cobre pueden interactuar con esta biomolécula de forma no covalente. Estas interacciones con el ADN incluyen unión intercalativa, electrostática y a los surcos de la hebra de ADN. Esta interacción entre el ADN y los complejos de cobre puede provocar la deformación de la estructura del ADN, lo que puede llevar a la ruptura de esta macromolécula.

Además, el cobre produce especies reactivas de oxígeno, como el radical hidroxilo o diferentes intermediarios basados en metales. Estas especies son fuertes oxidantes que provocan la oxidación directa y la ruptura de las hebras del ADN. Como resultado del daño en el ADN, los complejos de cobre pueden desencadenar la activación de las vías apoptóticas.

Otro mecanismo de acción de los complejos de cobre es actuar como inhibidores de las topoisomerasas. Las topoisomerasas son enzimas nucleares que participan en procesos celulares esenciales como la replicación, la transcripción y la mitosis. Debido a esto, estas enzimas son un blanco importante en el tratamiento contra el cáncer.

Otro de los blancos de los complejos de cobre es el proteasoma. El proteasoma 26S es un gran complejo de proteasas multicatalíticas, responsable de la degradación de proteínas dañadas o mal plegadas del citosol y el retículo endoplásmico. Además, el proteasoma es vital para la destrucción rápida de proteínas importantes, como los reguladores del ciclo celular y los factores de transcripción, por lo que la vía ubiquitina-proteasoma juega un rol importante en múltiples procesos celulares, como la progresión del ciclo celular y la apoptosis.

Se han reportado una gran variedad de complejos de cobre con actividad antitumoral promisorio [27]. Dentro de éstos, las Casiopeínas han sido los únicos en llegar a fase clínica. Son una familia de complejos de cobre (II) con fórmula general $[\text{Cu}(\text{NN})(\text{N}-\text{O})\text{H}_2\text{O}]\text{NO}_3$ o $[\text{Cu}(\text{N}-\text{N})(\text{O}-\text{O})\text{H}_2\text{O}]\text{NO}_3$, donde los ligandos N-N son heterociclos nitrogenados del tipo 1,10-fenatrolina o 2,2' bipyridina, y los ligandos donantes O-O puede ser acetilacetato o salicilaldehído [28]. Algunos compuestos de esta familia tienen elevada actividad antiproliferativa, incluso mejor que el CisPt sobre células tumorales de leucemia, ovario y útero, entre otras. Los ensayos *in vivo*, mostraron resultados prometedores, revelando actividades similares a drogas de referencia, y con toxicidad aceptable. Uno de estos compuestos, conocido como Casiopeína III-ia, ha completado los ensayos preclínicos y está en fase clínica I.

1.8 HIDRAZONAS

En los últimos años, las hidrazonas han surgido como una familia versátil de compuestos de creciente interés debido a sus múltiples aplicaciones. Estos compuestos contienen en su estructura el esqueleto (C=N-N), y se originan por interacción de compuestos carbonílicos con hidracina (H_2N-NH_2) o sus derivados. En particular, las N-acilhidrazonas se obtienen mediante una reacción de condensación de hidracidas ($H_2N-NH-COR'$) con aldehídos o cetonas en solventes orgánicos, tales como, etanol, metanol, tetrahidrofurano, butanol, ácido acético glacial o mezclas de ellos. El compuesto resultante contiene un grupo acilo unido al nitrógeno amínico (Figura 6)[29].

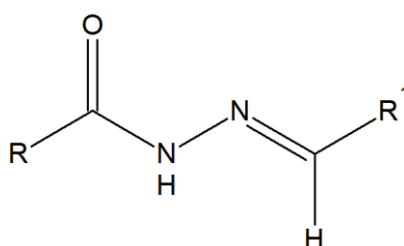


Figura 6. Estructura de N-acilhidrazonas.

Por su diversidad estructural y flexibilidad, las N-acilhidrazonas pueden interactuar con diversos iones metálicos a través de distintos modos de coordinación. Asimismo, la probabilidad de tautomería e isomería en estos ligandos incrementa notablemente el número de posibles complejos, debido a que pueden coordinar al ion metálico en la forma neutra amida o forma desprotonada iminol y, a su vez, como isómeros E o Z, adoptando diversos modos de coordinación [29].

Recientemente, las N-acilhidrazonas y sus complejos han ganado gran importancia debido a sus diversas propiedades biológicas, que incluyen actividades antibacterianas, antifúngicas, anticonvulsivas, antiinflamatorias, antituberculosas y antitumorales [30][31].

2 HIPÓTESIS

La hipótesis planteada en el presente trabajo de Tesis Doctoral sostiene que la complejación de metales de transición con compuestos de interés biológico, modificará incrementando la actividad propia de los metales o de los ligandos, permitiendo obtener compuestos con mejores propiedades farmacológicas, efectos antitumorales más potentes y/o menos tóxicos que los metales y ligandos sin complejar. Ejercen mayor Además, los complejos presentarán un mayor efecto antitumoral que el Cisplatino, metalofármaco utilizado en la clínica.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVOS GENERALES

Estudiar la actividad antitumoral de compuestos de cobre(II) con ligandos de interés biológico y/o farmacológico, en sistemas *in vitro* 2D (células en cultivo), 3D (esferoides tumorales) e *in vivo* (animales de laboratorio), incluyendo estudios de cito y genotoxicidad y de los posibles mecanismos de acción, a fin de hallar nuevos compuestos con potencial aplicación terapéutica para enfermedades como el cáncer. El propósito es contribuir al diseño racional de nuevos compuestos promisorios para posteriores investigaciones clínicas que determinen su aplicación como nuevas drogas adyuvantes para el tratamiento de tumores óseos y de mama.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1- Realizar un *screening* de la actividad antitumoral de compuestos de cobre(II) complejados con hidrazonas en las líneas de cáncer de mama (MDA-MB-231, MCF-7), y de cáncer de hueso (MG-63), en cultivos en monocapa y 3D.
- 2- Investigar los posibles mecanismos de acción de los compuestos en las líneas celulares de cáncer de mama y hueso (apoptosis, estrés oxidativo, etc.).

- 3- Investigar los efectos de los complejos sobre la genotoxicidad y capacidad de interactuar con el ADN.
- 4- Investigar las propiedades antitumorales en modelos *in vivo* (ratón N:NIH(S)-nu xenotransplantado con células tumorales de OSA (MG-63)) para determinar la capacidad antitumoral de los metalocompuestos con mayor actividad.

4 MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE LOS COMPLEJOS DE Cu(II)

Los complejos de Cu(II)-hidrazonas así como las hidrazonas utilizadas en esta tesis fueron sintetizadas y caracterizadas por el grupo de investigación de la Dra. Gonzalez Baró y la Dra. Beatriz Parajón-Costa del CEQUINOR con la cual mantenemos una colaboración activa. La síntesis de los complejos fue llevada a cabo siguiendo lo reportado en [32], [33], [34], [35] y [36].

La caracterización de los mismos incluyó: análisis Elemental, espectroscopía UV-vis y de reflectancia difusa, difracción de rayos X, espectroscopía vibracional FT- IR y Raman, Susceptibilidad magnética a diferentes temperaturas, Resonancia Paramagnética Electrónica (EPR), Resonancia Magnética Nuclear (RMN), Estudios termogravimétricos (TGA) y Análisis térmico diferencial (DTA).

4.2 LÍNEAS CELULARES EMPLEADAS

4.2.1 MDA-MB-231

La línea celular MDA-MB-231 fue aislada en 1978 por Cailleau *et al.* de un derrame pleural de una paciente con un adenocarcinoma invasivo de glándula mamaria [37]. Esta línea celular no expresa el receptor de estrógeno, el receptor de progesterona ni E-cadherina y expresa una forma mutada de p53. MDA-MB-231 es utilizada usualmente como modelo de cáncer de mama triple negativo.

4.2.2 MCF7

La línea MCF7 fue establecida en 1970 de un derrame pleural de una paciente de 69 años con carcinoma mamario metastásico por el Dr. Soule y colaboradores [38]. Esta línea celular expresa el receptor de estrógeno y el receptor de progesterona, perteneciendo al subtipo molecular luminal A. Es una línea celular muy poco agresiva y no invasiva, normalmente considerada con bajo potencial metastásico.

4.2.3 MG-63

La línea MG-63 fue aislada de un paciente varón caucásico de 14 años con OSA en 1977 por Billiau y colaboradores [39]. Esta línea es ampliamente utilizada en investigación

biomédica, como estudios de biocompatibilidad de implantes óseos y dentales, y es una de las líneas celulares más utilizadas en el estudio del cáncer óseo [40].

4.2.4 A549

La línea A549 fue aislada por primera vez en 1972 por D.J. Giard y colaboradores [41], a partir del 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. 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 [42].

4.2.5 HT-29

La línea HT-29 fue aislada de un adenocarcinoma de colon de una paciente caucásica de 44 años, en 1964 por Fogh y Trempe. Estas células no solo son usadas para estudios de la biología del cáncer, sino también son utilizadas para estudiar el proceso de digestión y biodisponibilidad, ya que expresan características similares a las células intestinales maduras. En su fenotipo diferenciado son capaces de formar una monocapa con uniones fuertes entre las células y el borde en cepillo típico. Estas son usadas frecuentemente para estudiar la respuesta inmune intestinal ante una infección bacteriana, así como el proceso de adhesión e invasión de los microorganismos.

4.2.6 L929

La línea L929, línea de fibroblastos murinos, es un subclon de la cepa parental L, la cual fue establecida por Earle y colaboradores en 1940 [43]. La cepa L fue obtenida de un tejido normal de un ratón C3H/An, macho de 100 días, y el clon 929 fue una de las primeras cepas en ser obtenidas a partir de clonación. La American Type Culture Collection (ATCC) recomienda el uso de esta línea en ensayos de biocompatibilidad y citotoxicidad.

4.2.7 MCF10A

La línea MCF10A fue establecida por Soule y colaboradores en 1990 [44] a partir de un paciente con una enfermedad fibrocística benigna. Es una línea celular mamaria no

maligna, que es ampliamente utilizada como modelo in vitro para el estudio del funcionamiento normal de las células mamarias y su transformación.

4.3 CONDICIONES DE CULTIVO

Las líneas MCF7, MG-63, A549 fueron cultivadas en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) adicionado con 100 UI/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina y 10 % v/v de suero fetal bovino (SFB).

La línea MDA-MB-231 fue cultivada en medio de cultivo DMEM F12 adicionado con 100 UI/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina y 10 % v/v de SFB.

La línea MCF10A fue cultivada en medio de cultivo DMEM F12 adicionado con 0,3 g/L de glutamina, 20 ng/ml de factor de crecimiento epitelial (EGF), 10 µg/ml de insulina, 0,5 µg/ml de hidrocortisona, 0,04 g/L de gentamicina y 10 % v/v de SFB.

Los cultivos se mantuvieron en botellas plásticas de 25 cm² y 75 cm² en una estufa a 37°C con atmosfera humidificada y con 5% de CO₂. Las células fueron subcultivadas empleando TrypLE™.

4.4 EVALUACIÓN DE LA VIABILIDAD CELULAR MEDIANTE ENSAYO DE MTT

El MTT es un ensayo colorimétrico indicador de la actividad metabólica celular, el cual se basa en la reducción de una sal de tetrazolio (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio, MTT), inicialmente de color amarillo, a un producto de color 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 [45].

Experimentalmente las células fueron sembradas (25000 células/pocillo) en placas de 96 pocillos y se incubaron bajo condiciones estándar de cultivo overnight. Posteriormente, a cada pocillo se le adicionaron diluciones con DMEM o DMEM F12,

dependiendo de la línea celular, de los diferentes complejos previamente disueltos en DMSO (solución stock). Las placas fueron incubadas según el periodo deseado. Al finalizar el tiempo de exposición, el medio de cultivo se descartó y cada pocillo se lavó con 200 μ L de PBS y finalmente se agregaron 100 μ L de una solución 0.5 mg/mL de MTT en DMEM. La placa se incubó a 37°C en oscuridad durante 3 horas, se descartó el sobrenadante, se lavó la monocapa y se agregaron 100 μ 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 de viabilidad 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.

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

4.5 EVALUACIÓN DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR A TRAVÉS DEL ENSAYO CLONOGÉNICO

Se utilizó el ensayo clonogénico o de formación de colonias para determinar el efecto del tratamiento con los diferentes compuestos. Dicho experimento permite evaluar la habilidad de una única célula de formar a lo largo del tiempo colonias que contengan como mínimo 50 células. 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 [46].

Experimentalmente, 1000 células (1,5 mL) por pocillo fueron sembradas en placas de 6 pocillos con DMEM + 10% de SFB. Al día siguiente el medio de cultivo fue reemplazado con diferentes concentraciones de complejos e incubadas durante 24h. Una vez que las células fueron expuestas al estímulo citotóxico, el medio fue reemplazado por 2 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, 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 las siguientes ecuaciones.

$$\text{Eficiencia de plaqueo (EF)} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de colonias formadas} \times 100}{\text{N}^\circ \text{ de células sembradas}}$$

$$\text{Fracción sobreviviente} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de colonias formadas}}{\text{EF}(\text{control}) \times \text{N}^\circ \text{ de células sembradas}}$$

4.6 INTERACCIÓN CON EL ADN

El ADN es uno de los principales blancos de muchas moléculas farmacológicamente activas, en especial agentes antitumorales. La unión de moléculas al ADN puede alterar y/o inhibir sus funciones, alterando la expresión de genes, la síntesis de proteínas o interfiriendo con la replicación, un paso clave en el crecimiento y división celular [47]. Para estudiar la interacción de los complejos con ADN y sus posibles modos de interacción se utilizó una solución de CT-ADN 2mg/ml en NaCl 0.9%. Para medir su concentración en M(nucleótidos) se midió su absorbancia a 260 nm.

4.6.1 Estudios UV-Vis

La espectroscopía UV-Vis se utiliza para monitorear los cambios que ocurren en el espectro del complejo o en el espectro del ADN al interaccionar entre ellos.

Para estudiar la naturaleza de la interacción se realizó un ensayo en el que midieron los espectros de absorción del CT-ADN al agregar concentraciones crecientes de los complejos. Luego de una incubación de 30 minutos a temperatura ambiente se midieron los espectros de absorción y se monitorearon los cambios en la absorbancia a 260 nm.

Para determinar la constante de unión del complejo al ADN, K_b , se realizó un ensayo en el que midieron los espectros de absorción de los complejos al agregar concentraciones crecientes de CT-ADN. Luego de una incubación de 30 minutos a temperatura ambiente se midieron los espectros de absorción y se monitorearon los cambios en la absorbancia en las bandas características para cada complejo. El valor de K_b para cada complejo se determinó utilizando la ecuación de Wolfe-Shimer:

$$\frac{[ADN]}{(\varepsilon_a - \varepsilon_f)} = \frac{[ADN]}{(\varepsilon_b - \varepsilon_f)} + \frac{1}{K_b(\varepsilon_b - \varepsilon_f)}$$

ε_a : Coeficiente de absorción del complejo con ADN, calculado como $A_{\text{obsd}}/[\text{complejo}]$

ε_f : Coeficiente de absorción del complejo libre

ε_b : Coeficiente de absorción del complejo totalmente unido al ADN

El valor de la constante se obtuvo de la relación entre la pendiente y la ordena al origen del gráfico $\frac{[ADN]}{(\varepsilon_a - \varepsilon_f)}$ vs $[ADN]$

4.6.2 Estudios de fluorescencia

Moléculas fluorogénicas con alta afinidad y unión selectiva al ADN pueden ser utilizadas para estudiar de manera indirecta la afinidad y el modo de interacción de metalodrogas. Ejemplo de este tipo de moléculas son el bromuro de etidio y DAPI, las cuales interaccionan con el ADN mediante intercalación y unión al surco menor respectivamente. Ambas moléculas incrementan su fluorescencia al interaccionar con el ADN. La presencia de otra molécula con afinidad por el ADN puede llevar a un desplazamiento del fluoróforo y una consecuente disminución de la fluorescencia [48].

Para este ensayo de fluorescencia de unión competitiva se utilizaron soluciones de BrEt ($1\mu\text{M}$) y DAPI ($1\mu\text{M}$) unidos a CT-ADN ($10\mu\text{M}$), las cuales fueron incubadas por 1h a 37°C . A estas soluciones de BrEt-ADN y DAPI-ADN se les agregó concentraciones crecientes de los complejos y se las incubó 30 minutos. Se midieron los espectros de emisión de fluorescencia para el BrEt y DAPI y se monitorearon los cambios en presencia de los complejos.

4.7 ENSAYO DE GENOTOXICIDAD. ELECTROFORESIS EN GEL DE UNA ÚNICA CÉLULA

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.

Las células se subcultivaron en placas de 12 pocillos (20000 células/pocillo) y fueron tratadas con el compuesto de interés, usando concentraciones inferiores al IC_{50} e incubadas 24h. Luego las células se resuspendieron en 75 μ 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. 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 Na₂EDTA, 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 Na₂EDTA, 40 mM HEPES-KOH y 0.2 mg/mL de albúmina sérica bovina con pH 8.0). Posteriormente las muestras se colocaron en buffer de electroforesis (1mM Na₂EDTA, 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 (λ excitación = 498 nm y de λ emisión = 522 nm). 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.

4.8 ESTRÉS OXIDATIVO: DETERMINACIÓN DE LA FORMACIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO (ERO).

Las ERO son especies con capacidad para alterar diversas estructuras celulares, particularmente el sistema intracelular de membranas y de esta forma desencadenar eventos citotóxicos o activar otras vías (cascadas enzimáticas) intracelulares que se

traducen en diversos efectos biológicos deletéreos para las células. La formación de ERO en los cultivos incubados con los compuestos de interés fue contrastada contra la producción basal (incubaciones sin agregado de compuestos). Para esto se utilizaron la oxidación de dihidrorodamina 123 (DHR) a rodamina (RH). La prueba se basa en que las especies altamente oxidantes, OH⁻ y ONOO⁻ / ONOOH, son capaces de oxidar la DHR a RH; esta última especie por ser fluorescente puede ser detectada midiendo la fluorescencia emitida a 536 nm cuando se excita a 500 nm [49].

Experimentalmente, se sembraron placas de 24 pocillos (1,5x10⁵ células/pocillo) en DMEM con 10% de SFB *overnight*. A continuación, se las incubó en DMEM a 37° C con concentraciones crecientes de los complejos durante 24hs. Luego, cada pocillo se lavó dos veces con solución salina buffer de Hank (HBSS) y se incubó 30 min con DHR (1 µg/mL) en HBSS con el fin de permitir el ingreso de la sonda fluorescente al citoplasma y su posterior oxidación. Finalmente, las células fueron lisadas con 1 mL de 0,1 % Tritón - X100 y se midió la intensidad de fluorescencia del extracto celular en un espectrofluorómetro RF 6000 Shimadzu. A una alícuota de cada extracto celular se le determinó el contenido total de proteínas por pocillo por el método del ácido bicinoninico (BCA) [50]. Los resultados se expresaron:

$$\frac{\mu\text{mol RH}}{\text{mg Proteína (\% Basal)}} = \frac{\left(\frac{\mu\text{mol RH}}{\text{mg Proteína}}\right)^x}{\left(\frac{\mu\text{mol RH}}{\text{mg Proteína}}\right)^c} \times 100$$

Donde: x = condición experimental y c = condición control (sin el agregado del complejo).

4.9 ENSAYO DE INHIBICIÓN DE LA ACTIVIDAD PROTEASOMAL

El sistema ubiquitina-proteasoma es el principal mecanismo de degradación de proteínas. La inhibición de la actividad tipo quimotripsina de la subunidad 26S del proteasoma está asociada a la inducción de muerte celular programada en células tumorales, ya que los inhibidores del proteasoma producen la acumulación de proteínas no deseadas dentro de la célula [51].

Para estudiar el efecto inhibitorio de los complejos las células fueron cultivadas en placas de 6 pocillos (3×10^5 células/pocillo) durante 24 hs. Luego se agregaron diferentes concentraciones de los compuestos y se incubaron por 24 hs. Finalizado el tiempo de incubación, las células fueron levantadas con Tryple™ (200 μ L) durante 5 minutos a 37°C y lavadas con PBS frío. Luego fueron resuspendidas en buffer de lisis (150 mM NaCl, 50 mM Tris pH 8 y 1% NP-40) y se centrifugaron 15 minutos a 13000 rpm y 4°C. El sobrenadante se incubó por 2 hs a 37 °C junto con el sustrato suc-LLVY-AMC y el buffer provisto por el kit comercial APT280 milipore™. La fluorescencia a 460 nm fue medida utilizando un espectrofluorómetro RF 6000 Shimadzu.

4.10 DETERMINACIÓN DE MUERTE CELULAR PROGRAMADA (APOPTOSIS)

La apoptosis se caracteriza por exhibir una variedad de cambios morfológicos entre los que se puede contar: la 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.

La fase temprana de la apoptosis celular se caracteriza por la traslocación de la fosfatidil serina (PS) desde la cara interna de la membrana celular hacia la externa y puede ser fácilmente detectada por medio de la tinción con anexina V, una proteína que naturalmente tiene alta afinidad por la PS y se encuentra conjugada con el fluorocromo FITC (Isotiocianato de fluoresceína).

Procesos apoptóticos más tardíos, como la pérdida de integridad de la membrana plasmática, son evaluados a través de colorantes vitales como el Ioduro de propidio (IP). Este colorante es excluido de células cuya membrana celular está intacta, pero en etapas finales de la apoptosis el IP puede ingresar al interior de la célula y adherirse al ADN y emitir fluorescencia.

En este ensayo $1,5 \times 10^5$ células por pocillo fueron cultivadas en placas de 12 pocillos (1000 μ L) *overnight* bajo condiciones estándar de cultivo. Las células fueron tratadas con diferentes concentraciones de complejos por 24 horas. 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 µL) durante 5 minutos a 37°C. Se agregaron 600 µL de DMEM con 10% SFB 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 µL de PBS, las células fueron resuspendidas y centrifugadas nuevamente. El PBS fue descartado y se agregaron 200 µL del buffer de unión y la suspensión celular fue homogenizada. De manera consiguiente, se agregaron 1 µL de anexina FITC a cada tubo y las muestras fueron transferidas a tubos aptos para citometría e incubados protegidos de la luz durante 20 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, antes de la medición se agregó 1 µL de IP (1 mg/mL).

Las células fueron analizadas utilizando el citómetro BD FACScalibur™ para el complejo 1, y el citómetro BD Accuri™ C6 para el complejo 2. De cada muestra se adquirieron 10000 eventos del *Gate* FSC vs SSC y las intensidades de fluorescencia fueron registradas en los canales FL1 y FL2.

4.11 PROTEÓMICA

4.11.1 Preparación de la muestra

Las células MDA-MB-231 y MG-63 fueron sembradas en una placa de 6 pocillos, incubadas por 24 hs y tratadas con 1 µM de los complejos. Luego de 24h, las proteínas totales fueron extraídas de las células mediante homogeneización en buffer RIPA. Luego, las proteínas fueron recogidas por centrifugación a 12000g por 20 minutos a 4°C. La concentración de proteínas fue determinada utilizando el ensayo BCA.

4.11.2 Identificación de proteínas y espectroscopía de masas

Las muestras se enviaron al Centro de Estudios Químicos y Biológicos por espectrometría de masas (CEQUIBIEM), para el análisis de cuantificación libre de etiquetas (*Label Free Quantification análisis*, LFQ). En resumen, las muestras se redujeron con DTT, fueron alquiladas con yodoacetamida, seguido de una digestión con tripsina. Las muestras se liofilizaron por *Speed VAC* y se resuspendieron en ácido trifluoroacético al 0.1%. Luego, se realizó una cromatografía líquida con nanoHPLC Easy nLC 1000 (Thermo Scientific) acoplado a un espectrómetro de masas con tecnología de Orbitrap (Thermo Scientific), que permite la separación y la identificación adicional de los péptidos.

El análisis de los espectros obtenidos por el espectrómetro de masas se realizó utilizando el motor de búsqueda *Proteome Discoverer* con la base de datos *Homo Sapiens*. Para la búsqueda, se establecieron los siguientes parámetros: se usó tripsina como proteasa de escisión; se permitieron dos escisiones perdidas; la tolerancia a la masa del péptido precursor se estableció en 10 ppm, mientras que la tolerancia a la masa del fragmento fue de 0,05 Da; la carbamidometilación (c) se estableció como una modificación fija; la modificación variable se estableció en oxidación; los criterios de identificación mínimos requerían un mínimo de 2 péptidos por proteína.

El análisis estadístico para determinar las proteínas expresadas diferencialmente se realizó utilizando el software Perseus v.1.6.6.0. La prueba t se utilizó para comparar los promedios de abundancia de las proteínas entre los grupos de tratamiento y control. Se identificaron proteínas expresadas diferencialmente cuando: p-valor <0.05 y se encontró un aumento o disminución en el nivel de proteína de 2 veces o más.

4.11.3 Análisis bioinformático

4.11.3.1 Análisis de enriquecimiento funcional GO

Las proteínas expresadas diferencialmente se utilizaron para realizar el análisis de enriquecimiento de *Gene Ontology* (GO) con el método API de *Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes* (STRING) [52]. Para eso, las proteínas sobre y subreguladas se clasificaron de acuerdo con su función molecular, proceso biológico y

componente celular. Para cada una de las diferentes categorías de GO, se calcularon la tasa de descubrimiento falso y los valores p corregidos por Bonferroni.

4.11.3.2 Análisis de interacciones proteína-proteína

La base de datos de STRING se utilizó para predecir interacciones funcionales entre las proteínas diferencialmente expresadas y para mapear las redes de interacción proteína-proteína [52]. Para el análisis de proteínas múltiples se utilizaron las siguientes fuentes de interacción: *text mining*, experimentos, bases de datos, coexpresión, cercanía, fusión genética y co-ocurrencia. Se usó un umbral de confianza medio predeterminado (0,4) para definir las interacciones proteína-proteína. Se aplicó *clustering* MCL (parámetro de inflación 3) al análisis para identificar grupos de proteínas con interacciones similares.

4.12 ENSAYOS EN CULTIVOS 3D

4.12.1 Cultivo de tridimensional de esferoides multicelulares (MCS)

Para la formación y crecimiento de los esferoides se combinaron dos técnicas: la técnica de *hanging drop* seguida por la técnica de *liquid overlay*.

En la técnica de *hanging drop*, los esferoides se forman bajo el efecto de la gravedad como estructuras sólidas suaves que pueden resistir pequeños impactos físicos durante el manejo. Para ello, se colocaron gotas (25 µl) de suspensión celular (60000 células/ml) en la tapa superior de una placa de Petri estéril, que luego fue invertida sobre la tapa inferior, quedando las gotas unidas a la tapa debido a la tensión superficial. La gravedad hace que las células se asienten y se concentren en el fondo de la gota, y se forme un solo esferoide por gota. La placa se incubó por 72 hs a 37°C en atmósfera humidificada con 5% CO₂.

Luego de la incubación, se utilizó la técnica de *liquid overlay*, en la que se inhibe la unión de las células a las placas de cultivo celular y se promueve la agregación de células-célula al utilizar placas con superficies poco adhesivas, como la agarosa. Para ello se utilizó una

placa de 96 pocillos en la que se agregaron 40 μ l de agarosa a cada pocillo y se dejó solidificar. Luego se colocaron 150 μ l de DMEM con 10% SFB (filtrado) y un esferoide (gota) por pocillo. Se incubaron durante 7 días a 37°C para permitir su crecimiento, realizando la renovación de medio cada 2 días. Al final de este periodo los esferoides alcanzaron un diámetro promedio de 400 μ m y se encontraron aptos para realizar experimentos con ellos.

4.12.2 Ensayo de viabilidad celular con Resazurina

Con el fin de determinar la viabilidad de los esferoides multicelulares (MCS) se empleó el ensayo de resazurina. La resazurina 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 sea necesario la utilización de solventes orgánicos [53].

Experimentalmente se siguieron los siguientes pasos: Los esferoides (MCS) fueron cultivados tal como se describe en la sección 3.12.1 y fueron expuestos a diferentes concentraciones de los complejos o drogas durante 48 hs. Una vez finalizada la incubación, se agregaron 10 μ L de resazurina (0,2 mg/ml) a cada pocillo. 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. 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.

$$\% \text{ Viabilidad esferoides} = \frac{\text{Fluorescencia MCS} - \text{Fluorescencia blanco}}{\text{Fluorescencia MCS Control} - \text{Fluorescencia blanco}} \times 100$$

4.12.3 Ensayo de capacidad de formación de esferoides

Para analizar el efecto de los compuestos sobre la capacidad de formar esferoides se realizó un pretratamiento sobre un cultivo en monocapa de células MCF7. Experimentalmente 2,5x10⁵ células por pocillo fueron cultivadas en placas de 12 pocillos (1000 µL) overnight bajo condiciones estándar de cultivo. Las células fueron tratadas con diferentes concentraciones por debajo del ic50 de los complejos por 24 horas. Una vez terminado el tratamiento, la monocapa celular fue levantada con Tryple™ (200 µL) durante 5 minutos a 37°C y resuspendida en 600 µL de DMEM con 10% SFB. Se tomó una alícuota de la suspensión celular para realizar un recuento de las células vivas y se procedió a realizar la formación de esferoides como fue explicada en la sección 3.12.1. Finalizada la formación de los esferoides, se analizó la viabilidad de los mismos mediante el ensayo con Resazurina.

4.12.4 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 de los esferoides y la capacidad reproductiva de las células que la componen, 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 3.12.1, expuestos a diferentes concentraciones de complejos e incubados a 37 °C con 0.5 % de CO₂ por 48 hs. Una vez que el tratamiento con el compuesto finalizó, los esferoides se transfirieron a una nueva placa de cultivo con DMEM + 10 % SFB, y se colocó nuevamente en la estufa a 37 °C por 48 hs. Luego de la incubación, los esferoides son fijados con metanol y teñidos con solución de GIEMSA (5%) durante 10 min. Se sacaron fotos a los esferoides con microscopio y *AmScope*, y se procesaron las imágenes con el programa *Image J*.

4.12.5 Evaluación de células madre cancerígenas

Las células madre cancerígenas (CSC) son una subpoblación de células tumorales que poseen la capacidad de autorrenovarse y diferenciarse para impulsar la iniciación, progresión, metástasis y recurrencia de los tumores. Una forma de identificar a las CSCs es mediante la expresión de ciertos marcadores de superficie celular característicos. Las CSCs de cáncer de mama se caracterizan por una alta expresión de CD44 y una baja expresión de CD24 (CD44⁺/CD24^{-baja}) [54].

En este ensayo $1,5 \times 10^5$ células por pocillo fueron cultivadas en placas de 12 pocillos (1000 μ L) overnight bajo condiciones estándar de cultivo. Las células fueron tratadas con diferentes concentraciones de complejos por 24 h. Una vez terminado el tratamiento, la monocapa celular fue levantada con Tryple™ y la suspensión celular fue transferida a tubos de centrifuga de 1.5 mL. Las células fueron lavadas con PBS y resuspendidas en una solución de PBS con 2% SFB y los anticuerpos CD44-PE (1:100) y CD24-FITC (1:200). Los tubos se incubaron en hielo por 1 h en oscuridad y luego se lavaron y resuspendieron en PBS. Finalmente, las muestras fueron analizadas en el citómetro BD Accuri™ C6. Para cada muestra se adquirieron 10.000 eventos y el análisis de datos se realizó con el software BD Accuri™ C6 PLUS.

4.12.6 Formación de mamoesferas

Las mamoesferas son estructuras tridimensionales compuestas por una alta proporción de células madres cancerígenas (CSC). La habilidad de un compuesto para inhibir la formación de mamoesferas a partir de una suspensión de células individuales es un buen indicador de su efecto sobre las CSC [55].

Experimentalmente, una suspensión de células MCF7 (100000 células/ml) se sembraron en una placa de 12 pocillos con superficie no tratada en medio DMEM sin suero, suplementado con B27 y EGF (20 ng/ml). Las células fueron tratadas con diferentes concentraciones de los complejos y se incubaron por 5 días a 37°C en atmósfera humidificada con 5% CO₂. Luego de la incubación, el número de mamoesferas formadas

fueron contadas con un microscopio invertido. La eficiencia de formación de mamoesferas se calculó según la siguiente ecuación.

$$\text{Eficiencia formación mamoesferas} = \frac{n^{\circ} \text{ mamoesferas formadas}}{n^{\circ} \text{ células sembradas}} \times 100$$

4.13 ESTUDIOS *IN VIVO*

Los ensayos *in vivo* fueron realizados en colaboración con el Centro de Oncología Molecular y Traslacional (COMTra) de la Universidad Nacional de Quilmes.

4.13.1 Animales

Se utilizaron ratones inmunocomprometidos *nude* atómicos hembra N:NIH(S), de 7-8 semanas de edad con un peso aproximado de 20 gramos, provistos por el bioterio de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata. Fueron mantenidos en gabinetes de aislamiento en condiciones estériles con aire filtrado (HEPA 99.99%). Los animales fueron mantenidos en jaulas de a 5 ratones, con libre acceso al agua y alimento.

4.13.2 Progresión tumoral de xenotrasplantes

La generación de tumores de OSA se llevó a cabo mediante la inoculación por vía subcutánea (s.c) de 5×10^6 células en 100 μ l DMEM mezclados con 50 μ l de Matrigel™ (Becton Dickinson) en el flanco derecho de ratones atómicos. El Matrigel™ es un extracto purificado de matriz extracelular secretada por células de sarcoma murino enriquecido en laminina, colágeno IV, entactina, proteoglicano de heparán sulfato y factores de crecimiento como TGF- β , FGF, EGF-, para favorecer la tasa de prendimiento de los tumores y disminuir su período de latencia.

Se utilizaron 5 animales por grupo experimental los cuales fueron: Control, CuHL1, y CisPt como metalodroga de referencia. Al cuarto día post inoculación de las células tumorales, tras confirmar el prendimiento tumoral en la totalidad de los animales, se

dio inicio al tratamiento. Los animales tratados con CuHL1 o CisPt recibieron dosis de 2 mg/kg/día por vía intraperitoneal (i.p.), administradas 3 días a la semana durante 4 semanas. El grupo control recibió únicamente vehículo salino también por vía i.p.

A lo largo del protocolo, se monitoreó la progresión tumoral mediante palpación periódica y registro del diámetro mayor y menor perpendicular del tumor utilizando un calibre 3 veces por semana. El volumen tumoral fue calculado con la fórmula: $0.52 \times \text{diámetro menor}^2 \times \text{diámetro mayor}$. También se analizaron las tasas de crecimiento tumoral (TCT), que representan la pendiente de la regresión lineal del volumen a lo largo del tiempo. Adicionalmente, se registró el peso de cada animal tres veces por semana con el fin de monitorear y detectar posibles efectos tóxicos de los tratamientos.

Cuando aparecieron los primeros signos de ulceración en algunos de los tumores y cuando aquellos de mayor tamaño alcanzaron un volumen mayor a 300 mm^3 los animales fueron fotografiados y el protocolo fue finalizado. Los animales fueron sacrificados por dislocación cervical y los tumores fueron removidos, fotografiados, pesados y fijados en formalina 10% para posteriores estudios histopatológicos.

4.13.3 Estudios histopatológicos

Las piezas pertenecientes a xenotrasplantes de células MG-63 fueron procesadas y montadas en portaobjetos cargados. Los cortes histológicos de los distintos grupos experimentales fueron teñidos mediante la técnica de hematoxilina y eosina (H&E).

Una vez finalizado el procesamiento y tinción de los preparados histológicos, se analizaron los índices mitóticos (IM) de los tumores pertenecientes a los distintos grupos experimentales. Se contaron los cuerpos mitóticos en campos seleccionados al azar (400X). Solamente las secciones viables de tejido fueron analizadas para el cálculo del índice mitótico. La cuantificación fue llevada a cabo de manera independiente por dos investigadores, enmascarando los respectivos grupos experimentales.

Para el análisis de la necrosis tumoral se tomaron fotos a color con una magnificación de 2.5X de toda la extensión de los preparados histológicos teñidos mediante H&E utilizando el equipo Cytation Gen5 Reader (BioTek). Las imágenes fueron adquiridas

utilizando una cuadrícula de 4x5 y la integración de la imagen mediante la técnica de stitching fue realizada con la función “Montaje de imágenes” utilizando un solapamiento del 10%. Las áreas necróticas tumorales se midieron utilizando el software ImageJ 1.5j8 (NIH). La necrosis tumoral fue identificada en aquellas áreas con un aumento marcado de eosinofilia y para ello la cuantificación del área necrótica (AN) y del área viable (AV) se realizó utilizando la herramienta “Color Threshold”. Posteriormente, la tasa de necrosis tumoral (TN) se calculó como: $TN = (AN * 100) / (AV + AN)$ en 6 secciones distintas por grupo experimental. El ajuste del porcentaje de áreas necróticas según el tamaño tumoral y la determinación de la tasa de necrosis tumoral ajustada (TNA) se realizó con la siguiente ecuación: $TNA = 100 - (100 - TN) \times TCTR$, en donde TCTR es la tasa de crecimiento tumoral relativa específica de cada grupo experimental. TCTR se obtuvo luego de transformar los valores de TCT ($8,6 \pm 0,8$ y $6,0 \pm 1,0$ mm³/día para el control y CuHL1, respectivamente), tomando la TCT del grupo control como “1”.

4.13.4 Estudios toxicológicos

El día final del protocolo de progresión tumoral, antes de la eutanasia, los animales fueron anestesiados con 100 mg/kg de ketamina intraperitoneal en combinación con 10 mg/kg de xylazina, y se recolectaron muestras de sangre anticoagulada con EDTA de cada uno de los sujetos experimentales para posteriores análisis hematológicos y bioquímicos. Se evaluaron los niveles de hematocritos, glóbulos rojos, blancos y plaquetas, colesterol, proteínas totales, bilirrubina directa, creatinina y albúmina, al igual que la actividad de la aspartato aminotransferasa y la alanina aminotransferasa. Adicionalmente, luego de la eutanasia, los riñones, el cerebro y el hígado fueron recuperados, fijados y procesados para una evaluación histopatológica.

4.14 MÉTODOS ESTADÍSTICOS EMPLEADOS

El análisis estadístico de los datos se realizó utilizando el análisis de varianza de un factor (ANOVA) seguido del test de Fisher para las comparaciones de diferencias y en algunos casos el test t de Student para la comparación de dos medias. Los resultados

representan la media \pm error estándar de la media (SEM). Todos los valores con $p < 0,05$ se consideraron estadísticamente significativo. Los cálculos a nivel estadístico fueron realizados empleando el programa Graphpad Prism 6.

5 RESULTADOS

5.1 COMPLEJOS DE COBRE

Los complejos utilizados en este trabajo fueron sintetizados y caracterizados por la Dra. María Rosa Rodríguez, la Dra. Verónica Ferraresi y la Dra. Yacelis Burgos, pertenecientes al grupo de trabajo de la Dra. Ana González Baró y Beatriz Parajón Costa.

5.1.1 Compuestos utilizados

5.1.1.1 CuHL1

El ligando 2-acetiltiofeno-2-hidroxi-3-metoxibenzohidrazona monohidrato (H_2L1) fue obtenido mediante la reacción de condensación de 3-metoxisalicialdehído (o-vainillín) y 2-tiofenocarbohidracida.

El complejo CuHL1 fue sintetizado a partir de una solución etanólica de nitrato de cobre (II) y el ligando H_2L1 . Se obtuvo un complejo catiónico, con carga 1+, de estequiometría 1:1 (L:M). El ligando coordina con el metal como un ligando monoaniónico ($HL1^-$), debido a la desprotonación del oxígeno fenólico, a través del sistema quelante ONO. La esfera de coordinación es completada con una molécula de agua, generando un entorno de cuadrado plano alrededor del Cu(II). El anión nitrato actúa como contraión y se ubica en posición apical respecto al plano del entorno de coordinación en la estructura cristalina. [32]

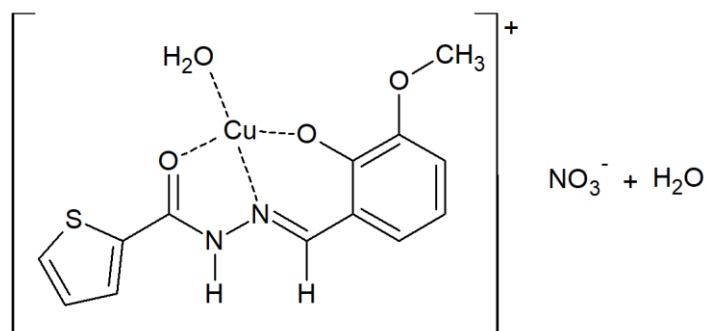


Figura 7. Representación esquemática de CuHL1

5.1.1.2 CuHL2

El ligando 2-acetil-4-metoxifenil-2-hidroxi-3-metoxibenzohidrazona (H_2L2) fue obtenido mediante la reacción de condensación de o-vainillín y 4-metoxibenzohidracida. El complejo CuHL2 fue sintetizado a partir de una solución etanólica de nitrato de cobre (II) y el ligando H_2L2 . Al igual que el complejo CuHL1, CuHL2 presenta una carga 1+ y una estequiometría 1:1 (L:M). El grupo fenólico del ligando se encuentra desprotonado, y el anión tridentado $HL2^-$ coordina con el Cu(II) a través del sistema quelante ONO. Dos moléculas de agua completan el entorno de coordinación de geometría piramidal cuadrada distorsionada. [33]

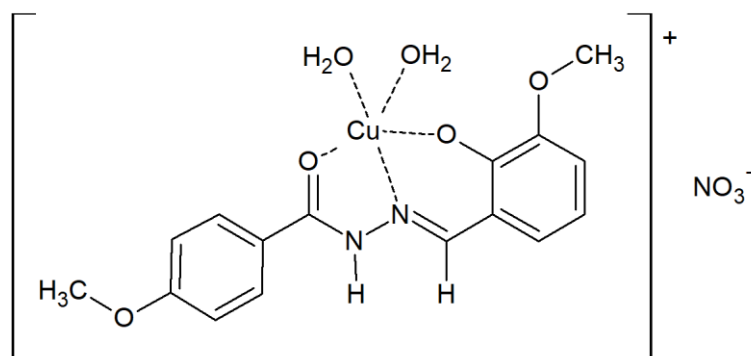


Figura 8. Representación esquemática de CuHL2

5.1.1.3 CuHL3

El ligando 2-acetil-4-hidroxifenil-2-hidroxi-3-metoxibenzohidrazona (H_2L3) fue obtenido mediante la reacción de condensación de o-vainillín y 4-hidroxi-benzohidracida. El complejo CuHL3 fue sintetizado a partir de una solución etanólica de nitrato de cobre (II) y el ligando H_2L3 . El complejo presenta una carga 1+ y una estequiometría 1:1 (L:M). La estructura, coordinación y geometría es igual a la descrita para el complejo CuHL2. [34]

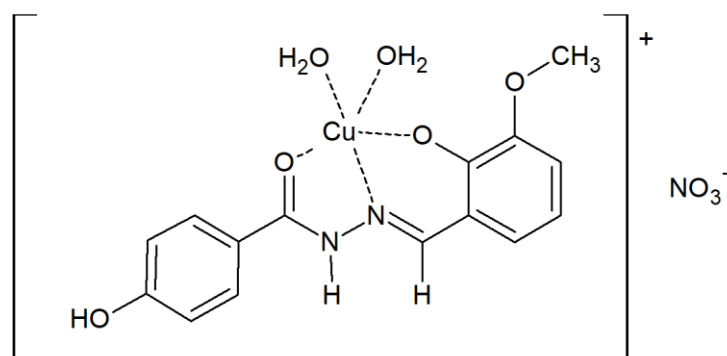


Figura 9. Representación esquemática de CuHL3

5.1.1.4 CuL_4

El ligando 4-metoxi,2-tiofenometilenbenzohidrazona (HL4) se obtuvo por condensación de los precursores 2-tiofencarboxaldehído y 4-metoxibenzohidracida. El complejo fue sintetizado a partir de una solución de acetato de cobre (II) y el ligando HL4. CuL_4 presenta una estequiometría 2:1 (L:M), dos ligandos aniónicos L_4^- actúan como ligandos bidentados unidos a través del átomo de O del grupo fenóxido y N del grupo imino, generando un entorno de geometría cuadrada plana.

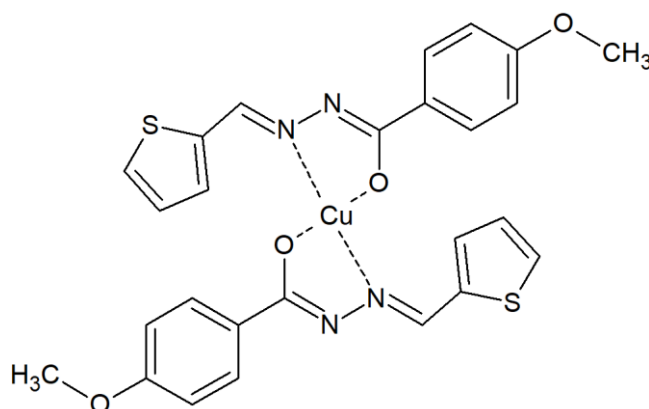


Figura 10. Representación esquemática de CuL_4

5.1.1.5 CuL_5

El ligando 2-metoxi-6-[[[(tiofen-2-metil)imino]metil]fenol] (HL5) se obtuvo por reacción de condensación entre los compuestos 2-tiofenometilamina y o-vainillin. El complejo CuL_5 fue sintetizado a partir de una solución de acetato de cobre (II) y el ligando HL5. El complejo resultante es neutro, con una estequiometría 2:1 (L:M). El Cu(II) se encuentra coordinado por dos ligandos desprotonados L_5^- , a través de los átomos donores O del grupo fenóxido y N del grupo imina, conformando un entorno cuadrado plano. [35]

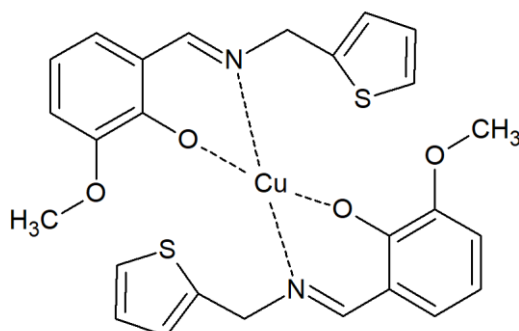
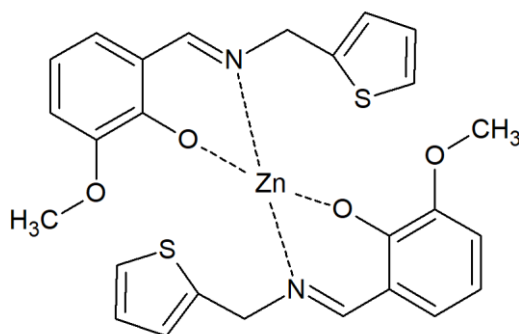


Figura 11. Representación esquemática de CuL5_2

También se utilizaron complejos del mismo ligando con otros centros metálicos, como el zinc y el vanadio.

5.1.1.6 ZnL5_2

El complejo ZnL5_2 fue sintetizado a partir de una solución de acetato de zinc (II) con el ligando HL5. En este complejo, el Zn(II) se encuentra coordinado por dos ligandos desprotonados (L5^-) que actúan como ligando bidentado a través de los átomos de O del grupo fenólico y N del grupo imina, formando un entorno tetraédrico alrededor del metal. [35]

**Figura 12.** Representación esquemática de ZnL5_2

5.1.1.7 VOL5_2

El complejo VOL5_2 fue sintetizado a partir de una solución de bis(acetilacetato) de oxovanadio con el ligando HL5. En este complejo, el vanadio se encuentra coordinado por dos ligandos desprotonados (L5^-) que actúan como ligando bidentado a través de los átomos de O del grupo fenólico y N del grupo imina, formando una geometría piramidal de base cuadrada alrededor del metal, con átomo de O del grupo oxidovanadio(IV) ocupando la posición apical. [36]

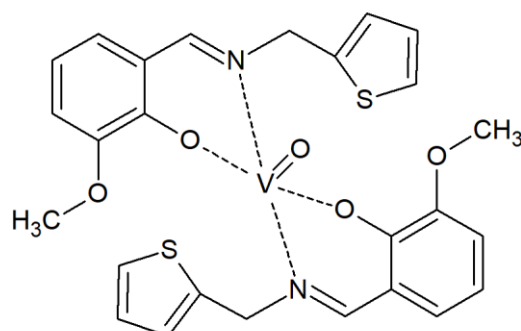


Figura 13. Representación esquemática de VOL5₂

5.1.2 Estudio de actividad anticancerígena

En primer lugar, se realizó un *screening* de la actividad citotóxica de los complejos en una serie de líneas de diferentes tipos tumorales humanos mediante el método del MTT. Se utilizaron las líneas de cáncer de mama MCF7 y MDA-MB-231, la línea de cáncer de pulmón A549, la línea de OSA MG-63 y la línea de cáncer de colon HT-29. En la tabla 1 se observan los valores de IC₅₀ obtenidos luego de 24hs de incubación para los compuestos planteados.

Tabla 1: Resultados de IC₅₀ (μM) de los complejos. Los resultados se expresan como la media ± SEM (n=3).

	<i>MCF7</i>	<i>MDA-MB-231</i>	<i>A549</i>	<i>MG-63</i>	<i>HT-29</i>
<i>CuHL1</i>	1,67 ± 0,09	1,65 ± 0,25	3,07 ± 0,60	1,98 ± 0,51	7,36 ± 0,91
<i>CuHL2</i>	1,70 ± 0,10	1,56 ± 0,08	2,82 ± 0,74	2,57 ± 0,30	9,71 ± 0,49
<i>CuHL3</i>	7,4 ± 1,1	5,8 ± 0,4	12 ± 1,2	8,8 ± 0,3	-
<i>CuL4₂</i>	> 25	> 25	> 25	> 25	
<i>CuL5₂</i>	13,9 ± 3,3	23,0 ± 1,5	> 50	-	-
<i>ZnL5₂</i>	43,6 ± 0,16	41,7 ± 2,9	> 50	-	-
<i>VOL5₂</i>	42,3 ± 4,7	29,0 ± 1,7	> 50	-	-

Del análisis del ensayo de viabilidad celular, se puede ver que los complejos con ligandos tridentados (1:1 L:M), CuHL1, CuHL2 y CuHL3, presentan una mayor actividad en todas

las líneas tumorales comparados con los complejos con ligandos bidentados (2:1 L:M), CuL₄₂ y CuL₅₂. En las líneas de cáncer de mama CuHL1, CuHL2 y CuHL3 exhiben valores de IC₅₀ en el rango submicromolar o micromolar bajos, mientras que los compuestos con los ligandos HL4 y HL5 presentan valores de 2 hasta 14 veces mayores. Se puede ver esta misma diferencia replicada en las líneas de cáncer de pulmón y OSA.

De estos resultados se puede inferir que la actividad citotóxica de los complejos de cobre está influenciada por la geometría y/o la carga de los mismos. Los complejos más activos son los que presentan una carga positiva 1+ y una estequiometría 1:1, mientras que los complejos con menor actividad antitumoral son compuestos neutros, sin carga, y con una estequiometría 2:1 (L:M). Esta diferencia se puede observar claramente entre los complejos CuHL2 y CuL₄₂. Los ligandos difieren sólo en la presencia de un O, el cual le permite coordinar de forma tridentada al H₂L₂, mientras que HL4 lo hace de forma bidentada. Esta diferencia lleva a un cambio en la estequiometría, geometría y carga de los complejos. En consecuencia, CuHL2 presenta una actividad antitumoral 14 veces mayor que CuL₄₂.

Las diferentes geometrías presentes en estos complejos pueden afectar la estabilidad de los mismos una vez dentro de la célula. Santini y colaboradores realizaron una extensa recopilación de complejos de cobre con actividad antitumoral. De este análisis encontraron que a menudo los compuestos más activos incluyen, en la esfera de coordinación del metal, grupos lábiles como agua, halógenos y otros solventes o contraiones débilmente coordinados. Además, los ligandos que coordinan al ion de cobre no deben buscar una disposición marcadamente estable del metal, ya que el complejo debe ser lo suficientemente estable como para transportar el metal hacia la célula tumoral sin interacciones irreversibles con entidades fisiológicas, pero lo suficientemente lábil como para permitir que el metal interactúe directamente con el sitio de unión una vez que haya alcanzado el blanco terapéutico [56].

Por otro lado, se puede ver la importancia que posee el ion metálico en la actividad antitumoral al comparar la serie de complejos del ligando HL5. Ninguno de los 3 complejos disminuyó la viabilidad de la línea de cáncer de pulmón A549 en el rango de concentraciones analizado. En cambio, éstos sí fueron activos en las líneas de cáncer de mama. El orden de actividad de mayor a menor fue: CuL₅₂> VOL₅₂> ZnL₅₂.

Los complejos más activos fueron CuHL1 y CuHL2. Ambos presentan una actividad similar, exhibiendo valores de IC_{50} en el rango submicromolar para la mayoría de las líneas tumorales. Sin embargo, ambos compuestos tienen una mayor actividad en las líneas de cáncer de mama, seguidas por la línea de OSA, mientras que la línea de cáncer de colon demuestra ser la más resistente a la acción de ambos complejos.

Resulta interesante comparar la actividad de los complejos CuHL2 y CuHL3. Estos compuestos solo difieren en la presencia de un grupo metoxifenilo o hidroxifenilo, respectivamente. Sin embargo, los valores de IC_{50} de CuHL3 son alrededor de 4 veces mayores que los obtenidos para CuHL2. Esto demuestra la importancia del ligando, y cómo pequeños cambios en su estructura pueden verse reflejados en la actividad de los complejos.

Teniendo estos resultados en cuenta, así como la vacancia farmacológica presente para este tipo de tumores reflejados en los diversos problemas con los tratamientos actuales, se decidió continuar con los estudios de la actividad anticancerígena de los complejos CuHL1 y CuHL2 en las líneas celulares de cáncer de mama y OSA.

5.2 CÁNCER DE MAMA

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

5.2.1.1 Viabilidad y proliferación celular

Para una correcta evaluación de la selectividad de los compuestos seleccionados anteriormente incluimos la línea no tumoral de mama MCF10. De esta manera, se evaluó la citotoxicidad de los complejos CuHL1 y CuHL2 mediante el ensayo MTT. El CisPt fue usado como agente antitumoral de referencia. Los resultados se pueden observar en la tabla 2 y en las gráficas de barra de la figura 14.

Tabla 2: Resultados de IC₅₀ (μM) de los complejos CuHL1 y CuHL2 y del CisPt. IS (índice de selectividad). Los resultados se expresan como la media ±SEM (n=3).

Líneas celulares	CuHL1	IS	CuHL2	IS	CisPt	IS
MCF7	1,67 ± 0,09	1,76	1,70 ± 0,10	2,62	42 ± 3	1,95
MDA-MB-231	1,65 ± 0,25	1,78	1,56 ± 0,08	2,86	131 ± 18	0,63
MCF10	2,94 ± 0,51		4,46 ± 0,82		82 ± 4 [57]	

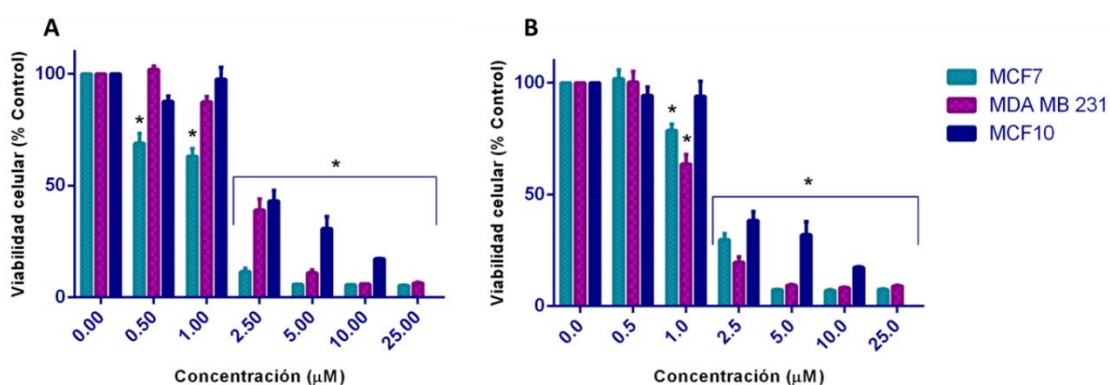


Figura 14. Gráficas de viabilidad celular vs concentración de los complejos. Método MTT. A: CuHL1, B: CuHL2. Los resultados se expresan como la media ±SEM (n=12). *Diferencia significativa con el control (p<0.05).

Se observa que ambos compuestos presentan una actividad antitumoral en un rango de concentraciones submicromolares en las dos líneas tumorales, con valores de IC_{50} similares. Al comparar con el metalofármaco de referencia, el CisPt, podemos ver que los complejos de cobre son más activos; éstos presentan valores de IC_{50} 25 veces menores para MCF7 y 80 veces menores para MDA-MB-231 comparados con el CisPt. Además, si analizamos los valores de IC_{50} reportados para drogas que son utilizadas actualmente en la clínica, como la doxorrubicina [58] y el paclitaxel [59], encontramos que estos valores son comparables con los de los complejos de cobre.

Se han reportado complejos de cobre con ligandos similares que presentan potente actividad citotóxica en líneas celulares de cáncer de mama. Lu y colaboradores sintetizaron cuatro complejos de Cu(II) con derivados de la base de Schiff vainillin y naproxeno, con una actividad antitumoral moderada contra células de cáncer de mama y células madre cancerígenas de mama ($37,6 \pm 3,3$ y $36,0 \pm 4,6$ μM respectivamente) [60]. Low y colaboradores reportaron la actividad anticancerígena de un complejo de Cu(II) con la base de Schiff derivada de S-bencilditiocarbazato y 3-acetilcumarina. Para las líneas de cáncer de mama MDA-MB-231 y MCF7 se encontraron valores de IC_{50} cercanos a 20 μM [61]. Además, la síntesis de un complejo de cobre (II) con el ligando tridentado (E)-N'-(5-bromo-2-hidroxibencilideno) benzohidrazida fue reportado por Gou y colaboradores. Este complejo mostró tener una importante citotoxicidad contra las líneas de cáncer de mama sensible a la doxorrubicina MCF7 ($IC_{50}=1,5$ μM) y la línea resistente a la doxorrubicina MCF7/ADR ($IC_{50}=1,8$ μM)[62].

Como hipótesis de trabajo se planteó que la complejación de un metal con un ligando puede aumentar la actividad de los compuestos. Es por esto que se analizó la actividad citotóxica de ligandos L1 y L2 y el Cu(II) libre. Se obtuvieron valores de IC_{50} mayores a 50 μM para L1, y mayores a 100 μM para L2 y Cu(II) libre. Estos resultados demuestran el importante papel que juega la complejación en la actividad antitumoral de estos compuestos. Este mismo efecto fue observado para los complejos CuHL3[34] y CuL5₂[35]; los complejos presentaron valores de IC_{50} entre 6 y 23 μM (Tabla 1), mientras que los ligandos exhibieron IC_{50} mayores a 100 μM .

Una de las propiedades necesarias para que un medicamento pueda ser utilizado en el tratamiento del cáncer es la selectividad, es decir, presentar actividad citotóxica

diferencial entre las células normales y las tumorales. Para determinar la selectividad de los complejos se estudió su citotoxicidad en células de fenotipo no tumoral de mama MCF10. Los efectos fueron evaluados calculando en índice de selectividad (IS) (Tabla 2). Ambos complejos presentan IS favorables, con una menor actividad sobre la línea no tumoral. CuHL2 tiene una mejor selectividad, ya que presenta un IC_{50} en MCF10 más de 2 veces mayor que en las líneas tumorales.

Por otro lado, se estudió el efecto de los complejos sobre el potencial proliferativo de las células después de recibir el tratamiento, mediante el ensayo clonogénico. Esta prueba estudia la capacidad de una célula única de proliferar y formar una colonia, lo cual es una característica de las células cancerosas.

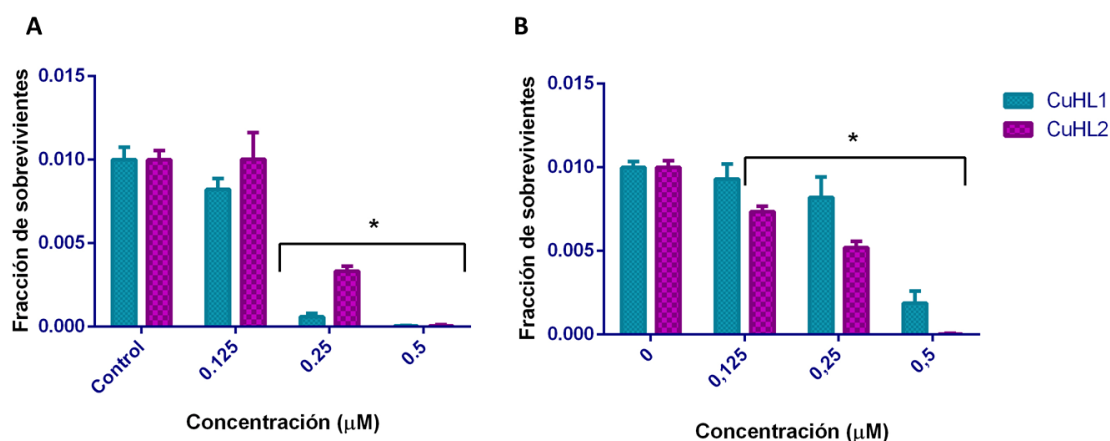


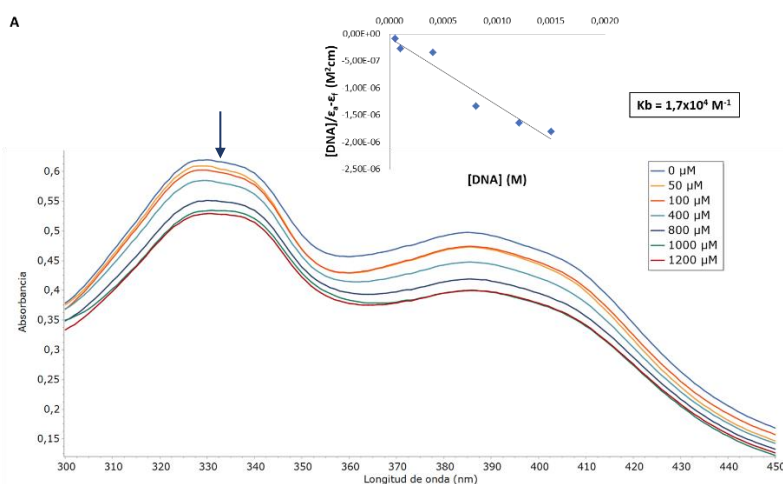
Figura 15. Ensayo Clonogénico. A: MCF7, B: MDA-MB-231. Los resultados se expresan como la media \pm SEM (n=6). * Diferencia significativa con el control (p<0.05).

En la figura 15 se puede observar como la fracción de sobrevivientes disminuye al aumentar la concentración de los complejos en ambas líneas tumorales. En la línea MCF7 se ve una mayor inhibición del crecimiento por CuHL1 a 0,25 μ M, y una actividad similar en 0,5 μ M. En cambio, en la línea MDA-MB-231 CuHL2 genera una mayor inhibición de la proliferación en 0,125, 0,25 y 0,5 μ M. Estos resultados tienen correlación con los obtenidos en los ensayos de citotoxicidad, ya que tienen una actividad citotóxica similar en ambas líneas, pero CuHL2 presenta un IC_{50} menor en la línea de cáncer triple negativo.

El efecto inhibitorio sobre la proliferación celular se observa ya a concentraciones en las que no se detectó disminución en la viabilidad celular. Por ejemplo, el tratamiento con CuHL2 produjo una disminución significativa de la viabilidad a partir de 2,5 μM en la línea MDA-MB-231, mientras que una concentración de 0,25 μM ya genera una inhibición en la formación de colonias. Efectos similares se observan para CuHL1. Esto se debe a que el ensayo clonogénico permite determinar la muerte reproductiva de una célula luego de un tratamiento con un compuesto citotóxico, es decir, permite establecer qué células retienen la capacidad de reproducirse y formar colonias [63]. El estudio de citotoxicidad realizado mediante el ensayo de MTT mide, en cambio, la viabilidad celular mediante la actividad metabólica de las células. De esta forma, el tratamiento con bajas concentraciones de los complejos pueden no estar afectando la actividad metabólica de las células pero sí su capacidad de reproducción[64].

5.2.1.2 Interacción con el ADN

La interacción de moléculas orgánicas o inorgánicas con el ADN puede influenciar en numerosos procesos biológicos en los cuales participa el ADN, como la transcripción y replicación [47]. La unión y consecuente daño al ADN han sido reportados como mecanismos de acción usuales de los complejos de Cu [65]. Es por esto que se evaluó la afinidad de los complejos CuHL1 y CuHL2 por CT-ADN, usando espectroscopia UV-vis.



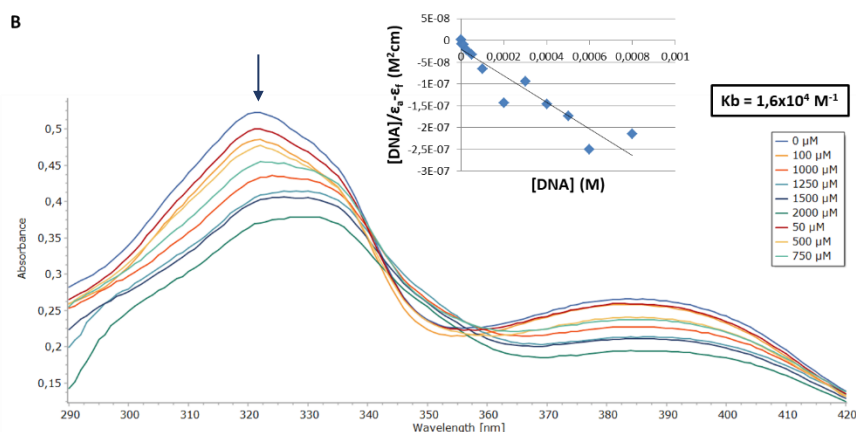
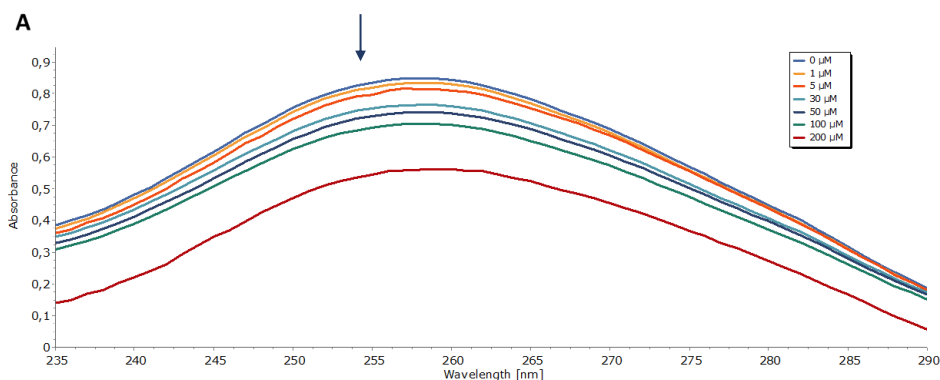


Figura 16. Espectro UV-Visible. (A): CuHL1, (B): CuHL2. La concentración de ADN es variable, mientras que la concentración de los complejos se mantiene constante (50 μM). La flecha en las gráficas muestra la disminución de la absorbancia con respecto a un aumento en la concentración de CT-ADN.

En la figura 16 se observa cómo se modifica el espectro de absorción de los complejos en presencia de CT-ADN. Para ambos complejos el agregado de cantidades crecientes de ADN produce una disminución en la absorbancia (hipocromismo) en la banda de 330 nm para CuHL1 y la banda de 322 nm para CuHL2, las cuales se atribuyen a transiciones de transferencia de carga ligando-metal [32][33]. La unión del ADN genera cambios en el espectro electrónico de los complejos metálicos, ya que la unión de las bases nitrogenadas puede perturbar las transiciones ligando-metal. El modo de unión intercalante usualmente genera un efecto hipocrómico y batocrómico, debido a las fuertes interacciones de *stacking* entre un cromóforo aromático y los pares de bases del ADN. Sin embargo, los complejos que interactúan con el ADN de forma no intercalante o electrostática pueden generar tanto un efecto hiperocrómico como hipocrómico [66].



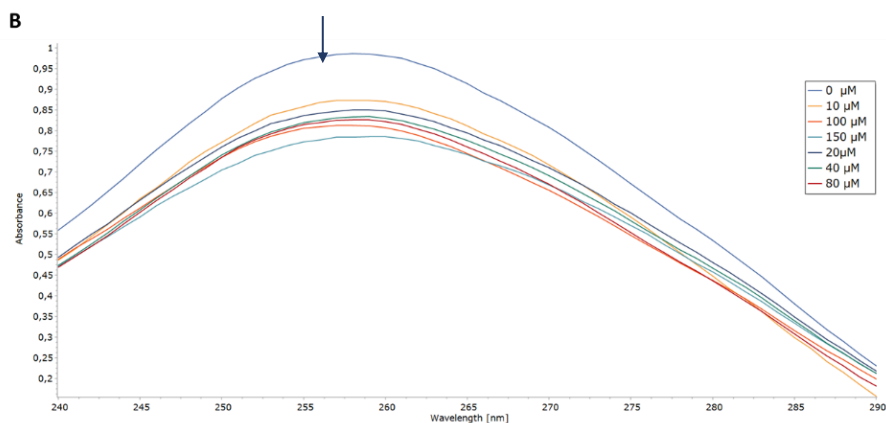


Figura 17. Espectro UV-Visible. (A): CuHL1, (B): CuHL2. La concentración de los compuestos es variable, mientras que la concentración del CT-DNA se mantiene constante (0,05 mg/ml). La flecha en las gráficas muestra la disminución de la absorbancia con respecto a un aumento en la concentración de los compuestos.

También se analizó cómo se modifica el espectro de absorción de CT-ADN al agregar cantidades crecientes de los complejos (Figura 17). El espectro de absorción UV-Vis del ADN tiene un máximo a 260 nm, consecuencia de los grupos cromóforos en las moléculas de purinas y pirimidinas responsables de las transiciones electrónicas. Un efecto hipocrómico en esta banda generalmente se asocia a una interacción del complejo con el ADN mediante intercalación entre las bases, ya que la inserción de especies planas aromáticas entre los pares de bases promueve la estabilización de la hélice de ADN. Un efecto hiperocrómico, en cambio, se produce por la desestabilización de la estructura helicoidal del ADN. Los compuestos que no interaccionan de forma intercalante, sino a través del surco menor también pueden generar efecto hipocrómico o hiperocrómico [66].

En la figura 17 se puede ver que la interacción de los complejos con el CT-ADN genera un efecto hipocrómico en la banda de absorción de 260 nm, la cual se asocia usualmente a una molécula intercalante. Se calculó la constante de unión (K_b) utilizando la ecuación de Wolfe-Shimer. Para CuHL1 $K_b=1,7 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$, mientras que para CuHL2 $K_b=1,6 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$. Estos valores de K_b indican una fuerza interacción moderada a fuerte entre los complejos y el ADN. Sin embargo, se encuentran por debajo del valor que presenta una molécula intercalante como lo es el bromuro de etidio ($K_b=1,4 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$).

Los resultados de los ensayos de UV-visible demuestran que ambos complejos son capaces de interactuar con el ADN. Para continuar con el análisis del modo de interacción de los complejos con el ADN se realizaron ensayos de fluorescencia de desplazamiento competitivo. Se utilizaron dos moléculas que incrementan su fluorescencia al interactuar con el ADN. Éstas son: el bromuro de etidio (BrEt), que interactúa con el ADN mediante intercalación, y el 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), que interactúa con el ADN mediante unión al surco menor.

El ensayo consiste en enfrentar el CT-ADN, previamente incubado con el colorante, al complejo, y registrar cómo se modifica fluorescencia. La presencia de otra molécula con afinidad por el ADN y modo de unión similar puede llevar a un desplazamiento del fluoróforo y una consecuente disminución de la fluorescencia.

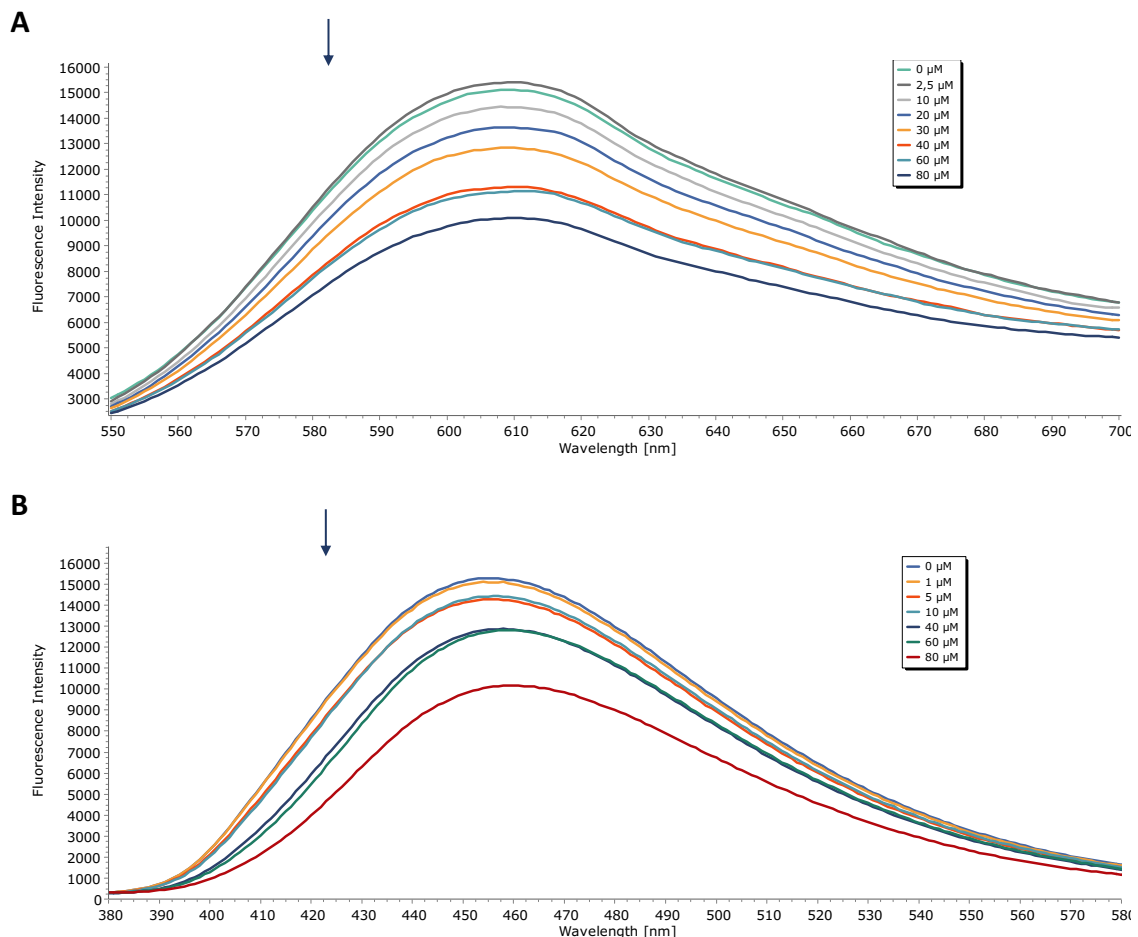


Figura 18. Espectro de emisión de fluorescencia de (A) BrEt y (B) DAPI, Unidos a CT-DNA (10 μM) en presencia de CuHL1 (0-80 μM). La flecha indica la disminución de la intensidad de la fluorescencia al incrementar la concentración de CuHL1.

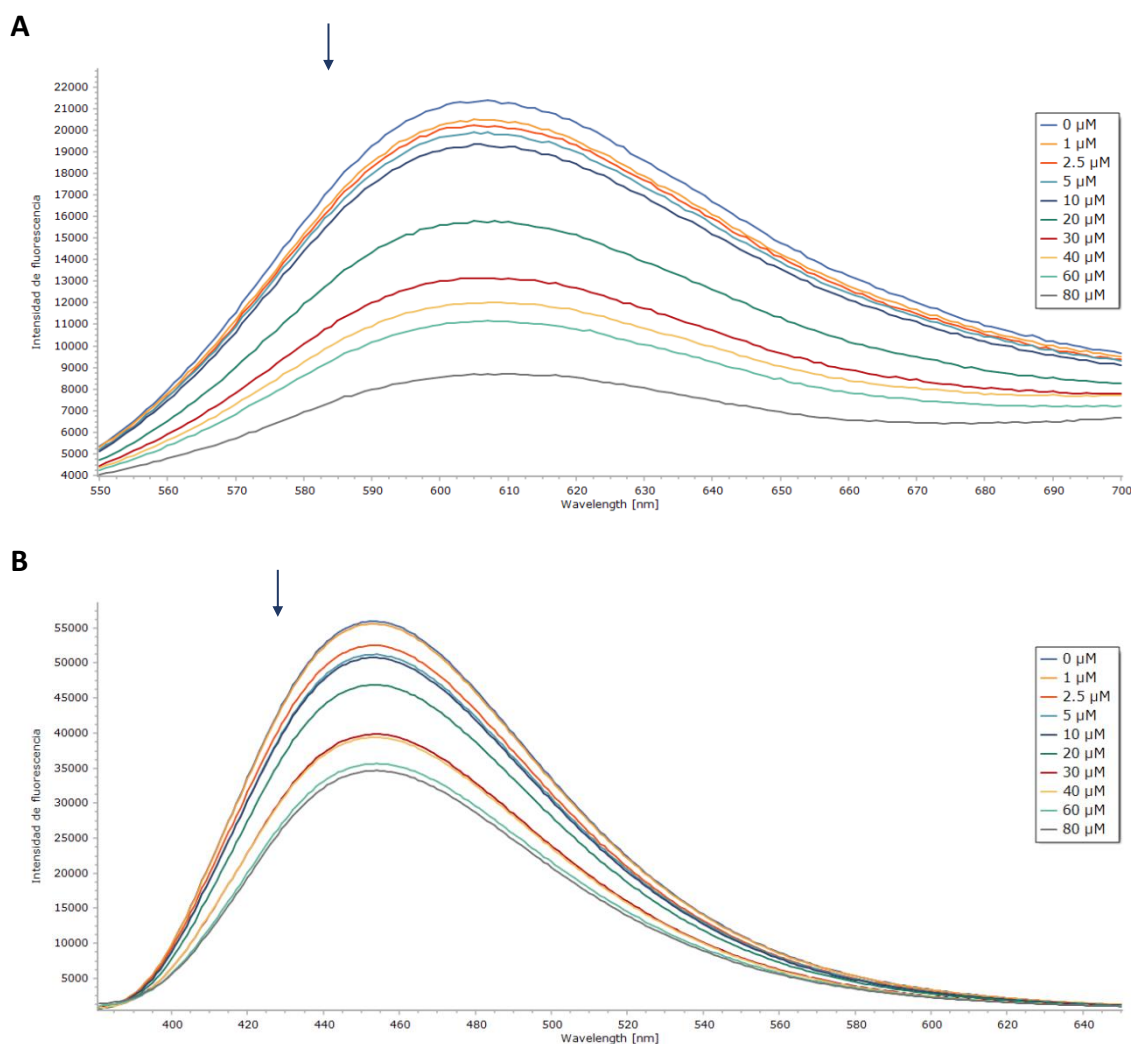


Figura 19. Espectro de emisión de fluorescencia de (A) BrEt y (B) DAPI, Unidos a CT-DNA (10 μM) en presencia de CuHL2 (0-80 μM). La flecha indica la disminución de la intensidad de la fluorescencia al incrementar la concentración de CuHL2.

En las figuras 18 y 19 se puede observar cómo tanto BrEt como DAPI disminuyen su intensidad de fluorescencia al agregar cantidades crecientes de CuHL1 o CuHL2. Esto sugiere que los complejos tendrían un comportamiento dual, siendo capaces de interactuar con el ADN tanto mediante intercalación como a través del surco menor.

Para estimar cuál es el modo de interacción predominante, se calculó el coeficiente de afinidad relativa al ADN (R) mediante el método Korobkova [67]. A partir de los datos de fluorescencia normalizada se calcularon los datos de la tabla 3.

Tabla 3. Cálculo del porcentaje de intercalación de CuHL1 y CuHL2.

Compuesto	C ₅₀ (B)	C ₅₀ (D)	RB ₅₀	RD ₅₀	RB ₅₀ / RD ₅₀	% I
-----------	---------------------	---------------------	------------------	------------------	-------------------------------------	-----

CuHL1	$8,92 \times 10^{-5}$	$1,58 \times 10^{-4}$	$7,72 \times 10^4$	$3,78 \times 10^4$	2,04	67%
CuHL2	$5,03 \times 10^{-5}$	$5,46 \times 10^{-4}$	$1,37 \times 10^5$	$1,09 \times 10^5$	1,25	56%

Nota: C_{50} es la concentración (M) del compuesto a la cual se alcanza una disminución del 50% de la fluorescencia del colorante. $R_{50} = \log[Kb(\text{colorante})]/C_{50}$; $Kb(\text{DAPI}) = 0,93 \times 10^6$; $Kb(\text{EB}) = 7,75 \times 10^6$. El porcentaje de intercalación se calculó como $\%I = [1 + (RB_{50}/RD_{50}) - 1] - 1 \times 100\%$. [67]

La relación RB_{50}/RD_{50} da una medida del modo de unión intercalante vs modo de unión por surco menor. Para CuHL1 esa relación es de 2,04, lo cual indica una preferencia por la intercalación. En cambio, para CuHL2 la relación es de 1,25 por lo que no habría preferencia por ninguno de los dos modos de interacción. De hecho, cuando analizamos los porcentajes de intercalamiento (%I), vemos que para CuHL1 representa el 67% de los modos de interacción, mientras que para CuHL2 representa el 56%.

Por lo tanto, los resultados demuestran que ambos compuestos son capaces de interactuar con el ADN mediante intercalamiento y unión al surco menor.

5.2.1.3 Genotoxicidad

Los efectos genotóxicos de CuHL1, CuHL2 y CisPt fueron estudiados, en las dos líneas de cáncer de mama, mediante el ensayo cometa. Este método permite evaluar daño en el ADN en células únicas, donde el largo de la cola del cometa (*Tail moment*) representa el nivel de daño en el material genético.

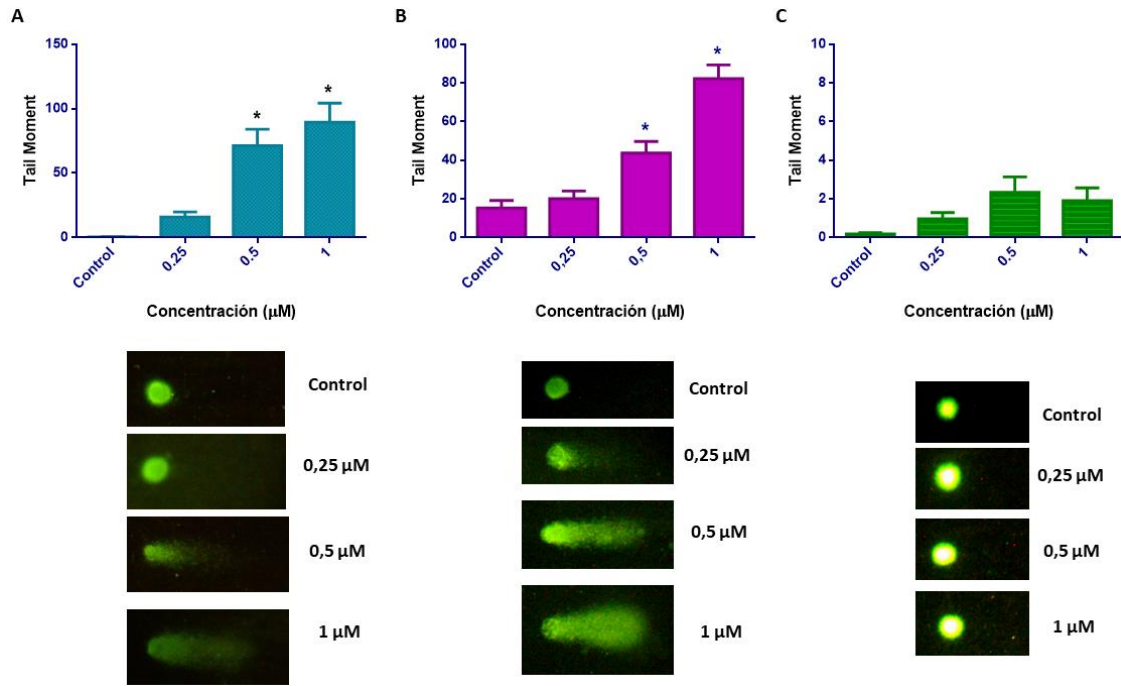


Figura 20. Genotoxicidad en la línea MCF7 de (A) CuHL1, (B) CuHL2 y (C) CisPt. Los resultados se expresan como la media \pm SEM (n=100). * Diferencia significativa con el control (p<0.05).

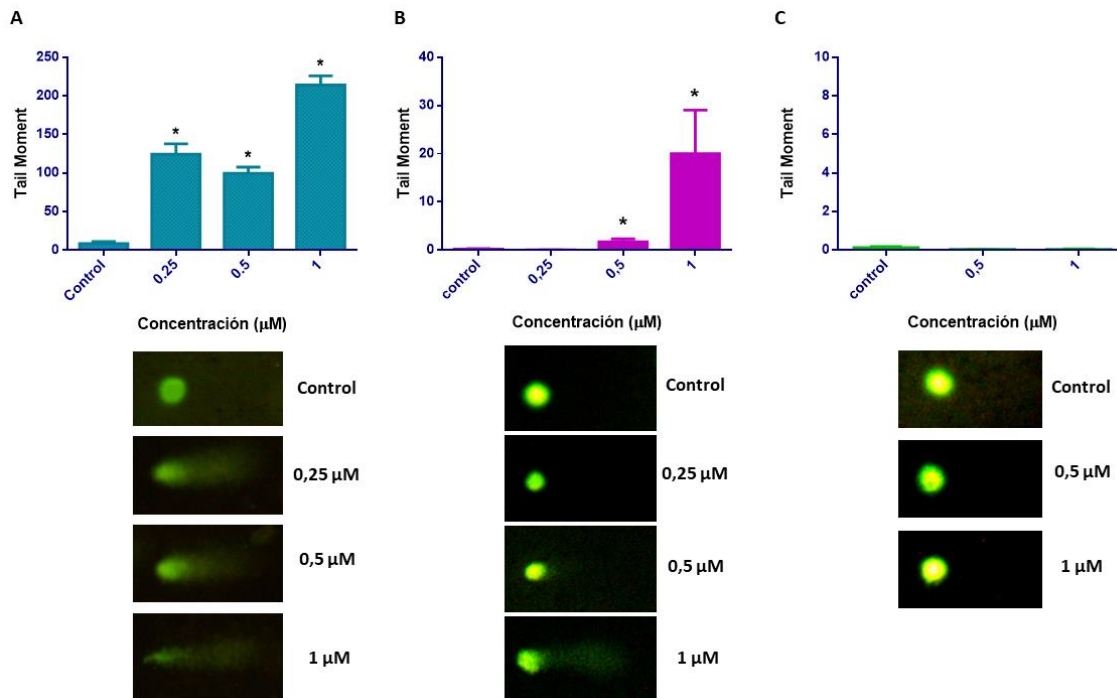


Figura 21. Genotoxicidad en la línea MDA-MB-231 de (A) CuHL1, (B) CuHL2 y (C) CisPt. Los resultados se expresan como la media \pm SEM (n=100). * Diferencia significativa con el control (p<0.05).

Se puede observar en las micrografías de las figuras 20 y 21, que en los controles las células no tienen apariencia de cometa, pero a medida que aumenta la concentración

de CuHL1 y CuHL2, aumenta el daño del ADN y el tamaño de los cometas. Estos resultados se ven reflejados en un incremento del *tail moment*. En ambas líneas celulares se observa un aumento significativo del *tail moment* al tratar las células con 0,5 y 1 μM de los dos complejos. En el caso de CuHL1 también hay daño significativo a 0,25 μM , y los valores de *tail moment* son mayores a los obtenidos para CuHL2.

Cabe destacar que el CisPt, una droga cuyo mecanismo de acción implica la unión y daño en el ADN, no produjo genotoxicidad en las concentraciones estudiadas. Esto puede deberse a que las concentraciones estudiadas son mucho menores a los valores de IC_{50} obtenidos para esta droga en las líneas de cáncer de mama. Cabe aclarar que las mismas fueron elegidas de manera comparativa a las concentraciones utilizadas para los complejos de cobre.

Todos estos resultados indican que ambos complejos son genotóxicos en las dos líneas tumorales de cáncer de mama a bajas concentraciones. Lo cual concuerda con el resultado anterior, en el que se demuestra que el ADN podría ser uno de los blancos moleculares relacionado con la actividad antitumoral de estos compuestos. Además, CuHL1 genera un mayor daño en el ADN en comparación a CuHL2, especialmente en la línea TNBC. Esto concuerda con los resultados anteriores de interacción con el ADN, ya que ambos complejos son capaces de interactuar con esta macromolécula, pero CuHL1 tiene un tipo interacción mayoritariamente intercalante.

5.2.1.4 Estrés oxidativo

Se sabe que las células cancerosas difieren notablemente de los tejidos sanos en su metabolismo redox. Además de los niveles intracelulares elevados de ERO, el entorno específico del tumor a menudo se caracteriza por una alta actividad metabólica, hipoxia y, en general, condiciones reductoras, lo que resulta en un estado persistente de estrés oxidativo en este tipo de células [68]. En consecuencia, la disrupción de la homeostasis redox, mediante la generación de ERO en las células tumorales y la inducción de estrés oxidativo, ha sido ampliamente investigada como blanco terapéutico en la química

medicinal, demostrando ser un mecanismo de acción efectivo en el tratamiento de diversos tipos de cáncer [69].

Se ha demostrado que la actividad citotóxica de numerosos complejos de cobre se debe a la capacidad de aumentar los niveles de ERO [70]. El cobre es un metal activo en las reacciones redox: el Cu(II) puede ser reducido a Cu(I) en el interior de la célula, produciendo peróxido; y de igual manera se produce una re-oxidación del Cu(I) a través de una reacción tipo Fenton, con la cual se producen otras especies de oxígeno reactivas como el radical hidroxilo [71].

Por lo tanto, se estudió la capacidad de los complejos CuHL1 y CuHL2 de generar ERO en las dos líneas de cáncer de mama. Se evaluó la generación mediante la oxidación de la sonda DHR-123, luego de un tratamiento por 24 hrs.

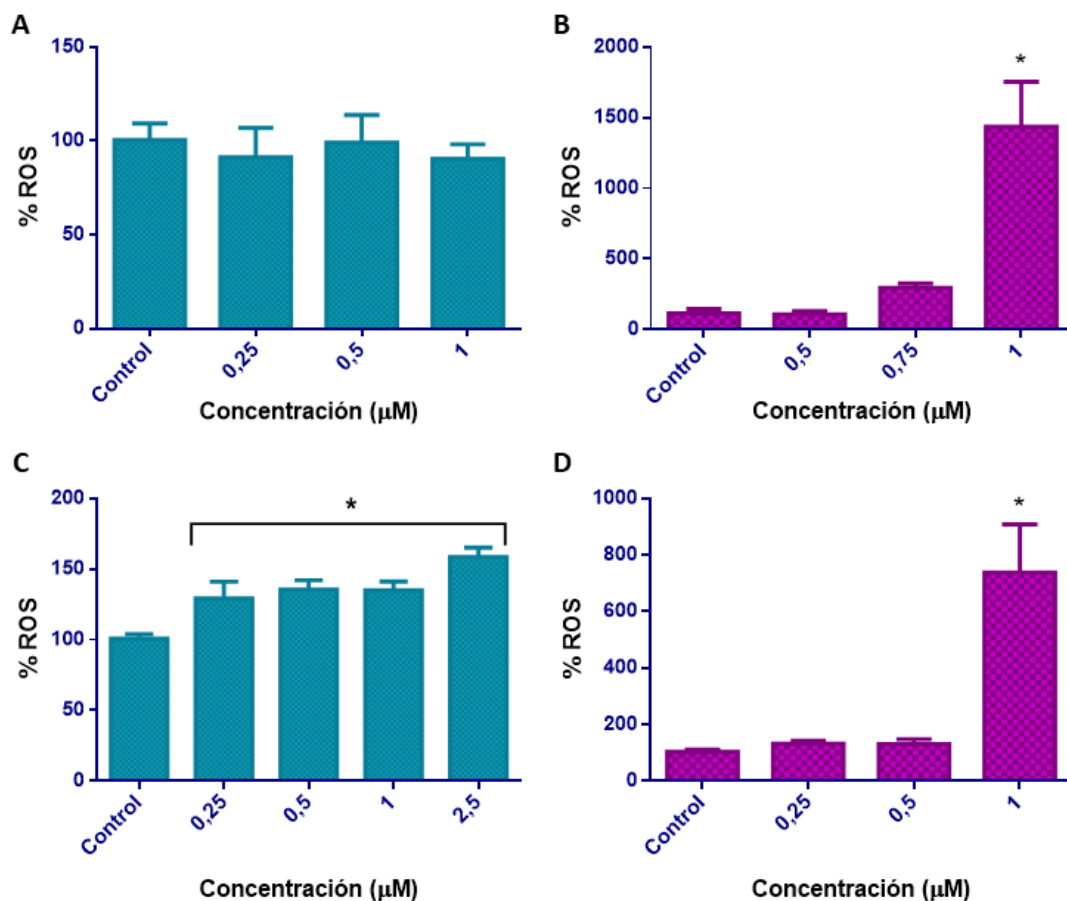


Figura 22. Producción de ERO, luego de un tratamiento de 24 hrs. Línea MCF7 tratada con (A) CuHL1 y (B) CuHL2. Línea MDA-MB-231 tratada con (C) CuHL1 y (D) CuHL2. Los resultados se expresan como la media \pm SEM (n=12). * Diferencia significativa con el control (p<0.05).

Los resultados observados en la figura 22 muestran efectos diferentes en la producción de ERO entre los dos complejos. El tratamiento con CuHL1 de las células MCF7 no generó un aumento significativo en los niveles de ERO; mientras que en las células MDA-MB-231 hay un incremento moderado de ERO, con aumentos de alrededor del 30% en el rango de concentraciones de 0,25 a 1 μM , y del 58% en 2,5 μM .

El tratamiento con CuHL2, en cambio, produjo un incremento marcado de la producción de ERO en ambas líneas celulares. En las células MCF7 hay un aumento del alrededor del 700%, mientras que en las MDA-MB-231 hay un aumento del 1300%. Esta diferencia en la capacidad de inducir ERO no se correlaciona con los resultados de citotoxicidad y genotoxicidad, ya que ambos complejos presentan efectos similares en la viabilidad celular y el daño del ADN. De hecho, uno de los principales mecanismos a través del cual los complejos de cobre generan daño en el ADN es mediante oxidación directa por generación de ERO [72]. Sin embargo, los estudios de interacción con el ADN y genotoxicidad demostraron que el complejo CuHL1 es capaz de generar mayor daño en la macromolécula, por lo que este daño no sería producido por vías oxidativas. Estos resultados podrían indicar que la generación de ERO no es el principal ni el único mecanismo de acción para estos complejos de cobre. De todos modos, resta utilizar otro tipo de sondas que detecten otros tipos de ERO así como el uso de *scavengers* específicos para tener mayor certeza sobre este tipo de mecanismos.

5.2.1.5 Actividad proteosomal

La inhibición de la actividad proteosomal es otro de los mecanismos comunes reportados para compuestos de cobre [27]. Se estudió el efecto de CuHL1 y CuHL2 sobre la actividad tipo quimiotripsina del proteasoma 26S en extractos de células de las líneas MCF7 y MDA-MB-231. La figura 23 muestra como en ambas líneas tumorales la incubación con los complejos produce una inhibición significativa de la actividad proteosomal. En MCF7, CuHL1 reduce la actividad proteosomal a un 69% con 10 μM , mientras que la misma concentración de CuHL2 la disminuye a un 54%. En el caso de

MDA-MB-231, CuHL1 presenta una mayor disminución de la actividad proteasomal, alcanzando un 45% a 10 μM , mientras que CuHL2 la disminuye al 53% a 7,5 μM .

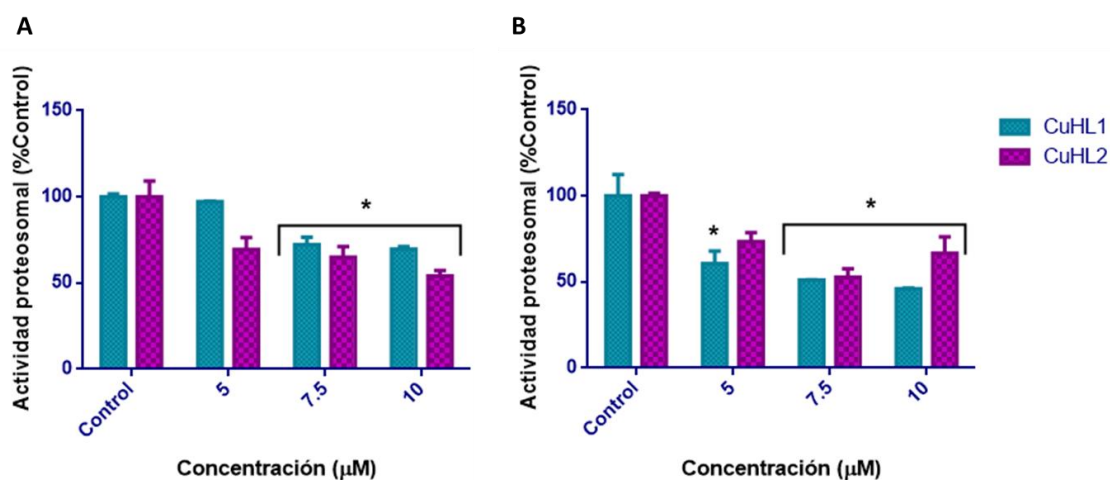


Figura 23. Ensayo de actividad proteasomal en extractos de células (A) MCF7 y (B) MDA-MB-231 luego de ser tratadas con los complejos por 2hs. Los resultados se expresan como la media \pm SEM (n=6). * Diferencia significativa con el control ($p < 0.05$).

El proteasoma 26S es un complejo multicatalítico con actividad proteasa, conformado por dos subunidades 19S regulatorias y un núcleo proteolítico 20S con actividades tipo quimiotripsina, tipo tripsina y tipo caspasa [73]. De esta forma, degrada proteínas que se encuentran marcadas con moléculas de ubiquitina. El complejo es responsable de la degradación de proteínas dañadas o mal plegadas. Además, el proteasoma juega un rol vital en la rápida degradación de proteínas importantes, como reguladores del ciclo celular y factores de transcripción. Es por esto que la vía ubiquitina-proteasoma es importante para el mantenimiento de múltiples procesos celulares, incluyendo progresión del ciclo celular, transducción de señales, diferenciación, proliferación y apoptosis [74]. La inhibición del proteasoma genera la acumulación de proteínas indeseadas en la célula, induciendo rápida y selectivamente la muerte celular. Se ha demostrado que las células cancerígenas son más sensibles a la inhibición proteasomal que las células normales [75].

Se han reportado numerosos complejos de cobre con la capacidad de inhibir la actividad proteasomal [76]. En particular para cáncer de mama, Zuo y colaboradores analizaron las propiedades antitumorales de dos complejos de Cu(II) con bases de Schiff derivadas de aminoácidos. Sólo uno de los complejos presentó actividad antitumoral en las líneas

celulares MCF7 y MDA-MB-231. Se demostró la capacidad de este compuesto de inhibir la actividad proteasomal, lo cual lleva a acumulación de proteínas Bax y a la inducción de la muerte celular programada [77].

En el mismo sentido, Zhang y colaboradores demostraron que un complejo de Cu(II) con una base de Schiff derivada de taurina es capaz de inhibir la actividad proteasomal en la línea de cáncer de mama MDA-MB-231. Esto genera la acumulación de las proteínas p27 y Bax y lleva a la consecuente inducción de la apoptosis [78].

Además, el complejo de Cu(II) con L-glutamina-o-vainillin, reportado por Xiao y colaboradores, demostró ser capaz de inhibir el proteasoma e inducir apoptosis en células de cáncer de mama, pero no en la línea de células mamarias normales MCF10 [79].

5.2.1.6 Inducción de Apoptosis

Se estudió la capacidad de los complejos de inducir la muerte celular programada. Para ello se trataron las células MCF7 y MDA-MB-231 durante 24hr. Este proceso se estudió usando citometría de flujo, mediante el uso de la doble tinción con Anexina V-FITC e yoduro de propidio (IP) como marcadores. Los resultados están representados en la figura 24 con gráficos de barras que muestran las diferentes poblaciones encontradas: células vivas (An-/IP-), células apoptóticas tempranas (An+/IP-) y células apoptóticas tardías (An+/IP+). En el anexo además se pueden observar las tablas con los porcentajes celulares en cada población, así como los *dot plots*.

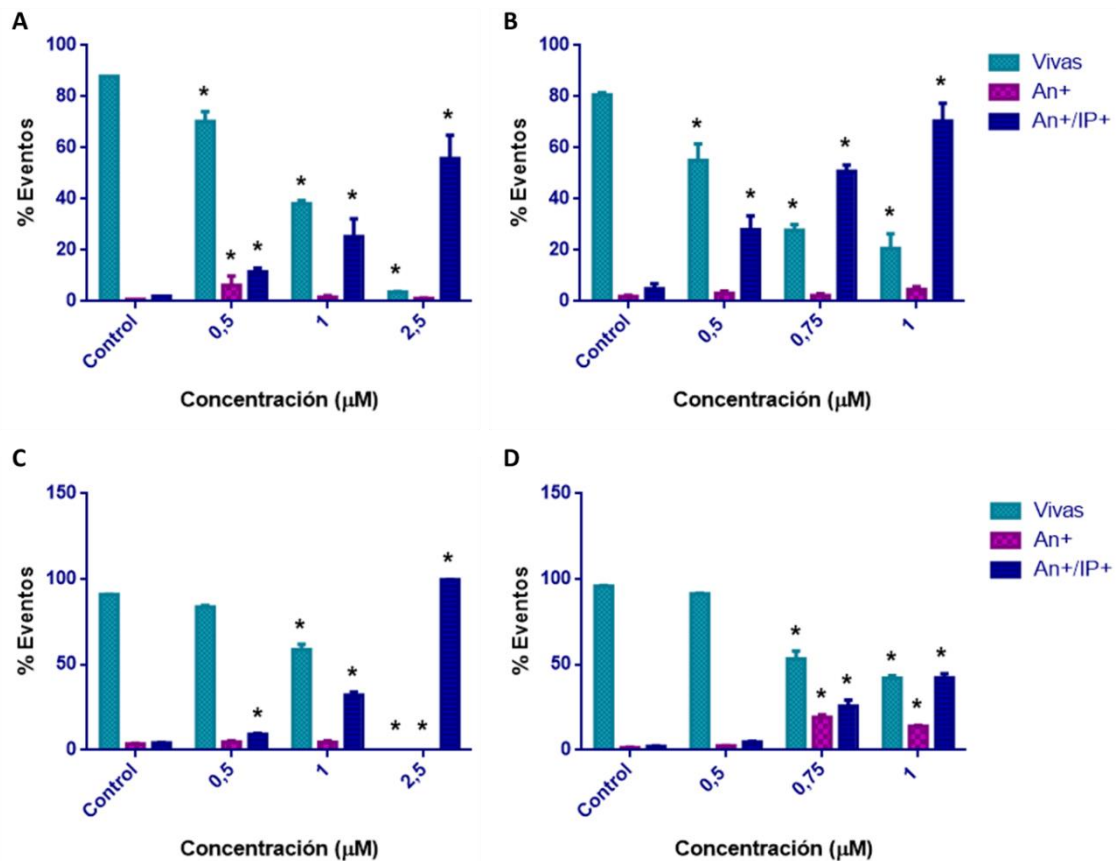


Figura 24. Evaluación de apoptosis mediante tinción con Anexina-FITC e IP. Se evaluó (A): CuHL1 en MCF7, (B): CuHL2 en MCF7, (C): CuHL1 en MDA-MB-231, y (D): CuHL2 en MDA-MB-231. Los resultados se expresan como el promedio \pm SEM (n=9). *Diferencias significativas con el control p<0.05.

En la línea MCF7 se ve un aumento significativo de las células apoptóticas tempranas luego de ser tratadas con 0,5 μ M de CuHL1 (6,3%). En la misma concentración se observa una población de células apoptóticas tardías, la cual corresponde al 11,5% de los eventos celulares. Al aumentar la concentración de CuHL1 hay un mayor desplazamiento a células apoptóticas tardías: con 1 μ M de CuHL1 obtenemos 25,3% de células An+/IP+, mientras que a 2,5 μ M esta población alcanza un 55,8%.

El tratamiento con CuHL2 en la línea MCF7 genera un aumento significativo de la población de células apoptóticas tardías dependiente de la concentración. Con 0,5 μ M la población An+/IP+ representa el 28,0%, con 0,75 μ M de CuHL2 aumenta al 50,8%, y finalmente con 1 μ M las células apoptóticas tardías alcanzan el 70,4 %.

En la línea MDA-MB-231, se observa un resultado similar luego del tratamiento con los complejos. CuHL2 produce un aumento significativo en la población de células

apoptóticas tempranas en las concentraciones 0,75 y 1 μM (19,1% y 13,4% respectivamente). La población de células apoptóticas tardías presenta incrementos notables dosis dependiente: 25,9% con 0,75 μM y 42,4% con 1 μM de CuHL2.

El tratamiento de las células MDA-MB-231 con CuHL1 produce, nuevamente, un aumento dependiente de la concentración de las células apoptóticas tardías: pasamos de 9,2% con 0,5 μM a 32,2% con 1 μM , alcanzando un 99,6% de células An+/IP+ con 2,5 μM de CuHL1.

Estos resultados sugieren que ambos complejos son capaces de inducir apoptosis de manera dosis dependiente en las dos líneas celulares de cáncer de mama, de forma consistente con lo observado en los ensayos previos de viabilidad celular.

5.2.1.7 Estudio de posibles blancos moleculares de CuHL1 y CuHL2

Para estudiar en mayor profundidad los posibles blancos moleculares relacionados a la actividad antitumoral de los complejos, se realizó un análisis de cuantificación relativa (*label-free quantitative proteomics*, LFQ) en extracto de células de la línea MDA-MB-231 tratadas con una concentración de 1 μM de los complejos CuHL1 y CuHL2. La proteómica es una herramienta muy poderosa para la investigación de los procesos celulares, ya que proporciona información detallada de las alteraciones de la homeostasis celular que pueden ser provocadas por la exposición a fármacos. Las alteraciones en las vías metabólicas y de señalización intracelular pueden dar información sobre qué partes de la maquinaria celular se ven afectadas por el tratamiento, lo que sugiere los objetivos biomoleculares más probables del compuesto [80].

El análisis LFQ con LC-MS/MS Orbitrap (Thermo Scientific TM) identificó proteínas que se expresan de manera diferencial entre las células tratadas con CuHL1 o CuHL2 y las células no tratadas. Las proteínas encontradas fueron filtradas según el cambio relativo y el *p*-valor significativo (Figura 25).

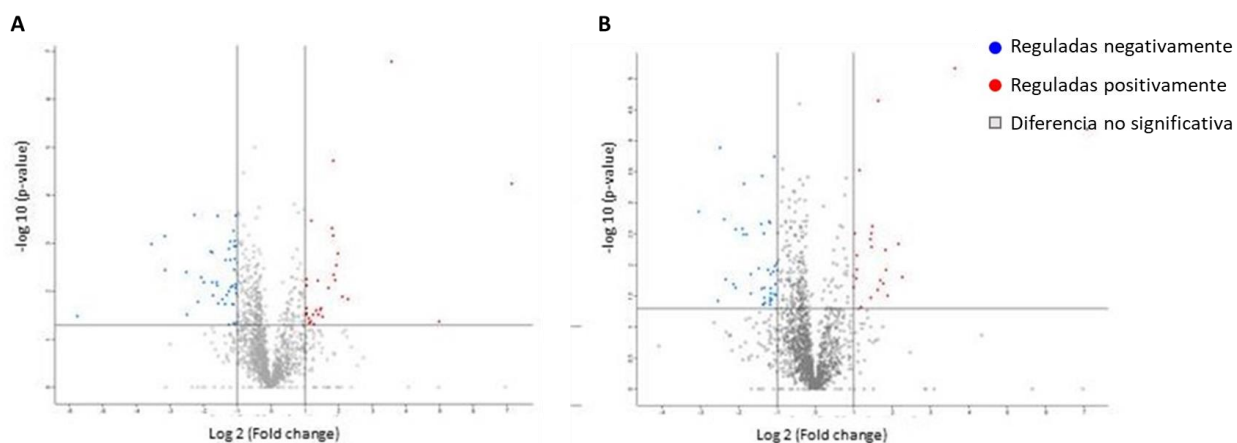


Figura 25. Volcano plots de $\log_{10}(\text{p-valor})$ vs $-\log_2(\text{cambio relativo})$ para las comparaciones de (A) CuHL1 vs Control y (B) CuHL2 vs Control.

De las células tratadas con CuHL1, se identificaron un total de 69 proteínas que se expresaron diferencialmente (sobre o sub) en comparación con el control. Entre éstas, 28 proteínas estaban sobre-expresadas y 41 proteínas estaban sub-expresadas (Tabla 4). A partir de las células tratadas con CuHL2, se identificaron un total de 63 proteínas diferencialmente expresadas en comparación con el control. Entre éstas, 23 estaban sobre-expresadas y 40 estaban sub-expresadas (Tabla 5).

Tabla 4. Proteínas diferencialmente expresadas en células MDA-MB-231 tratadas con CuHL1.

Gen	Proteína	Fold-change	p-value
HSPA1B	Proteína <i>Heat shock</i> 70 kDa 1B	11,9067	0,0000
SRXN1	Sulfiredoxina-1	4,8384	0,0144
CSTF3	Factor de estimulación de la escisión, subunidad 3	4,3157	0,0128
THBS1	Trombospondina-1	3,9412	0,0016
CHORDC1	Proteína 1 con dominio rico en cisteína e histidina	3,8146	0,0028
BAG3	Regulador de chaperonas 3 de la familia BAG	3,7564	0,0058
SLC25A3	Proteína transportadora de fosfato, mitocondrial	3,6397	0,0046
HSPH1	Proteína <i>Heat shock</i> 105 kDa	3,5744	0,0007
DNAJB1	DnaJ homóloga subfamilia B miembro 1	3,5735	0,0000
GCLM	Subunidad reguladora de la Glutamato--cisteina ligasa	3,4930	0,0005
SLC25A5	Taslocasa ADP/ATP 2	3,2590	0,0085

ARF3	Factor 3 de ribosilación del ADP	2,8776	0,0335
MAP1LC3B2	Proteínas asociadas a microtúbulo 1A/1B cadena ligera 3 beta 2	2,7896	0,0222
DDX21	Helicasa de RNA nucleolar 2	2,7624	0,0244
KTN1	Kinectina	2,6451	0,0302
MMP1	Colagenasa intersticial	2,6260	0,0060
ACTC1	Actina, músculo cardíaco 1	2,5367	0,0247
FUS	Proteína de unión a ARN	2,3718	0,0305
DNAJA1	DnaJ homóloga subfamilia A miembro 1	2,2815	0,0003
TECR	Reductasa de enoil-CoA de cadena larga	2,2753	0,0422
ARHGEF18	Factor de intercambio de nucleótido de gaunina Rho 18	2,1868	0,0453
RPL12	Proteína ribosomal 60S L12	2,1825	0,0442
ZNF622	Proteína <i>zinc finger</i> 622	2,1629	0,0360
RPL21	Proteína ribosomal 60S L21	2,0765	0,0283
TOP2A	ADN topoisomerasa 2-alpha	2,0762	0,0075
RPS8	Proteína ribosomal 40S S8	2,0729	0,0227
RPL7A	Proteína ribosomal 60S L7a	2,0663	0,0055
RPL10	Proteína ribosomal 60S L10	2,0453	0,0303
SDC4	Sindecano-4	-54,1800	0,0332
CYP51A1	Lanosterol 14-alpha demetilasa	-11,7752	0,0010
FADS2	Desaturasa de ácidos grasos	-8,9256	0,0007
ALG2	Alpha-1,3/1,6-manosiltransferasa	-8,8383	0,0036
RRM2	Ribonucleósido-bifosfato reductasa subunidad M2	-5,7327	0,0040
SMCHD1	Proteína 1 de mantenimiento estructural de cromosomas	-5,6365	0,0302
DPYD	Dihidropirimidina deshidrogenasa [NADP(+)]	-4,8430	0,0003
POLD1	ADN polimerasa	-4,4882	0,0165
NFKB2	Factor nuclear NF-kappa-B subunidad p100	-4,2297	0,0051
IRF2BPL	Probable E3 ubiquitina-proteína ligasa	-3,9927	0,0064
TP53	Antígeno tumoral celular p53	-3,4861	0,0015
LDLR	Receptor de lipoproteína de baja densidad	-3,3732	0,0065
TMX1	Proteína transmembrana 1 relacionada con tiorredoxina	-3,3412	0,0015

PSMD4	Subunidad 4 regulatoria no ATPasa de proteasoma 26S	-3,3016	0,0123
DNAAF5	Factor de montaje 5 de Dineina axonemal	-3,0889	0,0065
TST	Tiosulfato sulfurotransferasa	-3,0300	0,0075
PXDN	Homólogo de peroxidasa	-3,0016	0,0003
OGFR	Receptor de factor de crecimiento opiode	-2,9898	0,0177
ENG	Endoglina	-2,7407	0,0145
FAF1	Factor 1 asociado a FAS	-2,5783	0,0183
MCM5	Factor de replicación del ADN MCM5	-2,5649	0,0022
ADSS2	Adenilosuccinato sintetasa isoenzima 2	-2,4898	0,0118
GIPC1	Proteína con dominio PDZ	-2,4031	0,0494
ACO1	Aconito hidratasa citoplasmática	-2,3932	0,0013
PRPSAP2	Proteína 2 asociada a fosforibosil pirofosfato sintasa	-2,3817	0,0099
DNAJA3	DnaJ homóloga subfamilia A miembro 3	-2,3163	0,0022
DLAT	Dihidrolipolisina-residuo acetiltransferasa componente del complejo piruvate deshidrogenasa, mitocondrial	-2,3145	0,0009
SNX5	Clasificación de nexina 5	-2,2927	0,0082
PCK2	Fosfoenolpiruvato carboxikinasa [GTP], mitocondrial	-2,2247	0,0184
IGFBP7	Proteína 7 de unión a factor de crecimiento tipo insulina	-2,2145	0,0077
NDRG3	Proteína 3 reguladora <i>downstream</i> del gen N-myc	-2,1762	0,0005
KRT73	Keratina, tipo II citoesquelética 73	-2,1747	0,0458
PC	Piruvato carboxilasa, mitocondrial	-2,1747	0,0187
CORO7	Coronina	-2,1529	0,0035
POLDIP2	Proteína 2 que interactúa con la polimerasa delta	-2,1529	0,0011
ACOT2	Acil-coenzima A tioesterasa 2, mitocondrial	-2,1328	0,0021
MAP2K2	Proteína 2 kinasa activada por mitógeno de doble especificidad	-2,1182	0,0009
MAGED2	Antígeno D2 asociado a melanoma	-2,1069	0,0476
IDH3A	Isocitrato deshidrogenasa [NAD] subunidad alpha, mitocondrial	-2,0820	0,0012
ALDH2	Aldehido deshidrogenasa, mitocondrial	-2,0759	0,0003
SLC9A3R1	Cofactor NHE-RF1 regulatorio del intercambio Na(+)/H(+)	-2,0756	0,0071

Tabla 5. Proteínas diferencialmente expresadas en células MDA-MB-231 tratadas con CuHL2.

Gen	Proteína	Fold- change	p- value
HSPA6	Proteína 6 <i>Heat shock</i> 70 kDa	135,1126	0,0001
HSPA1B	Proteína 1B <i>Heat shock</i> 70 kDa	12,4443	0,0000
SRXN1	Sulfiredoxina-1	4,7883	0,0157
BAG3	Regulador de chaperonas 3 de la familia BAG	4,4887	0,0045
G3BP2	Proteína 2 de unión a proteína activadora de Ras GTPasa	3,6714	0,0310
THBS1	Trombospondina-1	3,5660	0,0120
CHORDC1	Proteína 1 con dominios ricos en cisteína e histidina	3,5336	0,0057
FXR2	Proteína 2 relacionada con el síndrome de retraso mental frágil X	3,4133	0,0198
SLC25A3	Proteína transportadora de fosfatos, mitocondrial	3,2324	0,0178
DNAJB1	DnaJ homóloga subfamilia B miembro 1	3,0959	0,0000
SLC25A5	Traslocasa ADP/ATP 2	3,0855	0,0253
GCLM	Subunidad reguladora de la glutamato-cisteína ligasa	2,8046	0,0024
ATAD3A	Proteína 3A que contiene el dominio AAA de la familia ATPasa	2,7501	0,0031
MMP1	Colagenasa intersticial	2,7465	0,0051
MAP1LC3B2	Proteínas 1A/1B asociadas a microtúbulos cadena ligera 3 beta 2	2,7147	0,0338
HSPH1	Proteína <i>Heat shock</i> 105 kDa	2,7037	0,0038
SDHA	Succinato deshidrogenasa [ubiquinona], mitocondrial	2,2722	0,0472
DNAJA1	DnaJ homóloga subfamilia A miembro 1	2,2136	0,0003
ZNF622	Proteína <i>Zinc finger</i> 622	2,1139	0,0070
AKAP2	Proteína de anclaje quinasa-A 2	2,0990	0,0117
TMCO1	Canal de calcio activado por carga de calcio	2,0869	0,0164
SLC3A2	Cadena pesada del antígeno de superficie celular 4F2	2,0386	0,0031
AHSA1	Activador de ATPasa de proteína <i>Heat shock</i> 90 kDa	1,9963	0,0228

SMCHD1	Proteína 1 de mantenimiento estructural de cromosomas	-8,2820	0,0014
NFKB2	Factor nuclear NF-kappa-B subunidad p100	-5,8093	0,0379
DPYD	Dihidropirimidina deshidrogenasa [NADP(+)]	-5,6316	0,0001
RRM2	Ribonucleosido-difosfato reductasa subunidad M2	-5,2034	0,0018
FADS2	Acil-CoA 6-desaturasa	-5,0562	0,0169
DNAAF5	Factor de montaje 5 de Dineina axonemal	-4,3873	0,0202
U2AF1	Factor de <i>splicing</i> U2AF 35 kDa subunidad	-4,2363	0,0027
SDC4	Sindecán-4	-4,2206	0,0232
ACSL4	Ácido graso de cadena larga-CoA ligasa 4	-3,7610	0,0026
CYP51A1	Lanosterol 14-alfa demetilasa	-3,6858	0,0032
TP53	Antígeno tumoral celular p53	-3,6284	0,0005
GFM1	Factor de elongación G, mitocondrial	-3,4629	0,0032
LDLR	Receptor de lipoproteína de baja densidad	-3,2341	0,0284
OGFR	Receptor de factor de crecimiento opiode	-3,2299	0,0139
RIN1	Interactuador de Ras y Rab 1	-2,7981	0,0113
FAF1	Factor asociado a FAS 1	-2,6790	0,0022
MCM2	Factor de replicación del ADN MCM2	-2,6450	0,0239
PCK2	Fosfofenolpiruvato carboxikinasa [GTP], mitocondrial	-2,6115	0,0004
SUMF2	Enzima generadora de C-alpha-formilglicina inactiva 2	-2,5908	0,0432
HNRNPUL1	Ribonucleoproteína nuclear heterogénea tipo U 1	-2,5669	0,0440
PXDN	Homólogo de peroxidasa	-2,5552	0,0031
MCM3	Factor de replicación del ADN MCM3	-2,5299	0,0332
DNAJA3	DnaJ homóloga subfamilia A miembro 3	-2,5193	0,0231
PACS1	Proteína de clasificación de grupos ácidos de fosfofurina 1	-2,4865	0,0405
POGLUT3	Proteína O-glucosiltransferasa 3	-2,3599	0,0119

SCYL1	Proteína tipo kinasa N-terminal	-2,3123	0,0020
FASN	Ácidos grasos sintasa	-2,2785	0,0382
VIM	Vimentina	-2,2682	0,0343
MCM5	Factor de replicación del ADN MCM5	-2,2670	0,0021
TRIM28	Factor intermediario de transcripción 1-beta	-2,2658	0,0431
CDC37	Co-chaperona de Hsp90	-2,2547	0,0236
YARS2	Tirosina--ARNt ligasa, mitocondrial	-2,2501	0,0139
SMC2	Proteína de mantenimiento estructural de cromosomas 2	-2,2447	0,0288
ITGB4	Integrina beta-4	-2,2163	0,0362
PTK7	Proteína tirosin-kinasa inactiva 7	-2,1469	0,0128
CORO7	Coronina	-2,1154	0,0290
ACOT2	Acil-coenzima A tioesterasa 2, mitocondrial	-2,1016	0,0002
TBC1D9B	Miembro de familia de dominio TBC1 9B	-2,0811	0,0103
MYO18A	Miosina no convencional XVIIIa	-2,0581	0,0201
CALM2	Calmodulina 2	-2,0396	0,0306

Para comprender mejor las características biológicas de las proteínas diferencialmente expresadas, se utilizaron un conjunto de herramientas bioinformáticas. En primer lugar, se utilizó el análisis de enriquecimiento de STRING para analizar si hay enriquecimiento de alguna de las categorías de *Gene Ontology* (GO). Para cada complejo, se cargaron dos listas diferentes que contenían las proteínas sobre-reguladas y sub-reguladas. La base de datos de GO clasifica funcionalmente a las proteínas en tres categorías: el proceso biológico, la función molecular y el componente celular. Las figuras 26 y 27 muestran los términos GO que se encuentran estadísticamente sobrerrepresentados (valor $p \leq 0,05$ después de la corrección de Benjamini).

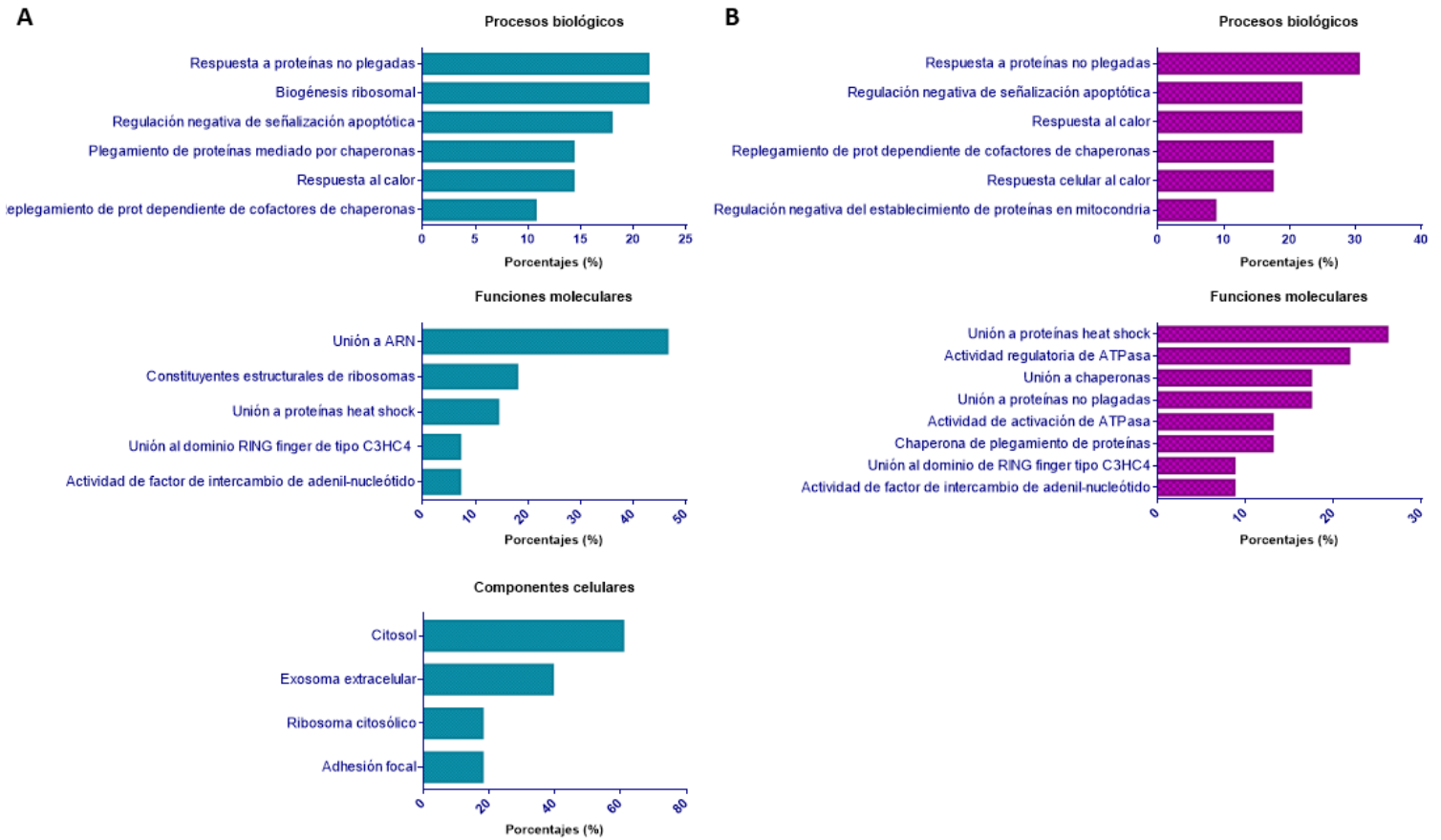


Figura 26. Análisis de enriquecimiento GO de las proteínas sobre-expresadas luego del tratamiento con (A) CuHL1 y (B) CuHL2. Los porcentajes de representación de cada categoría fueron determinados como el porcentaje sobre el total de las proteínas diferencialmente expresadas.

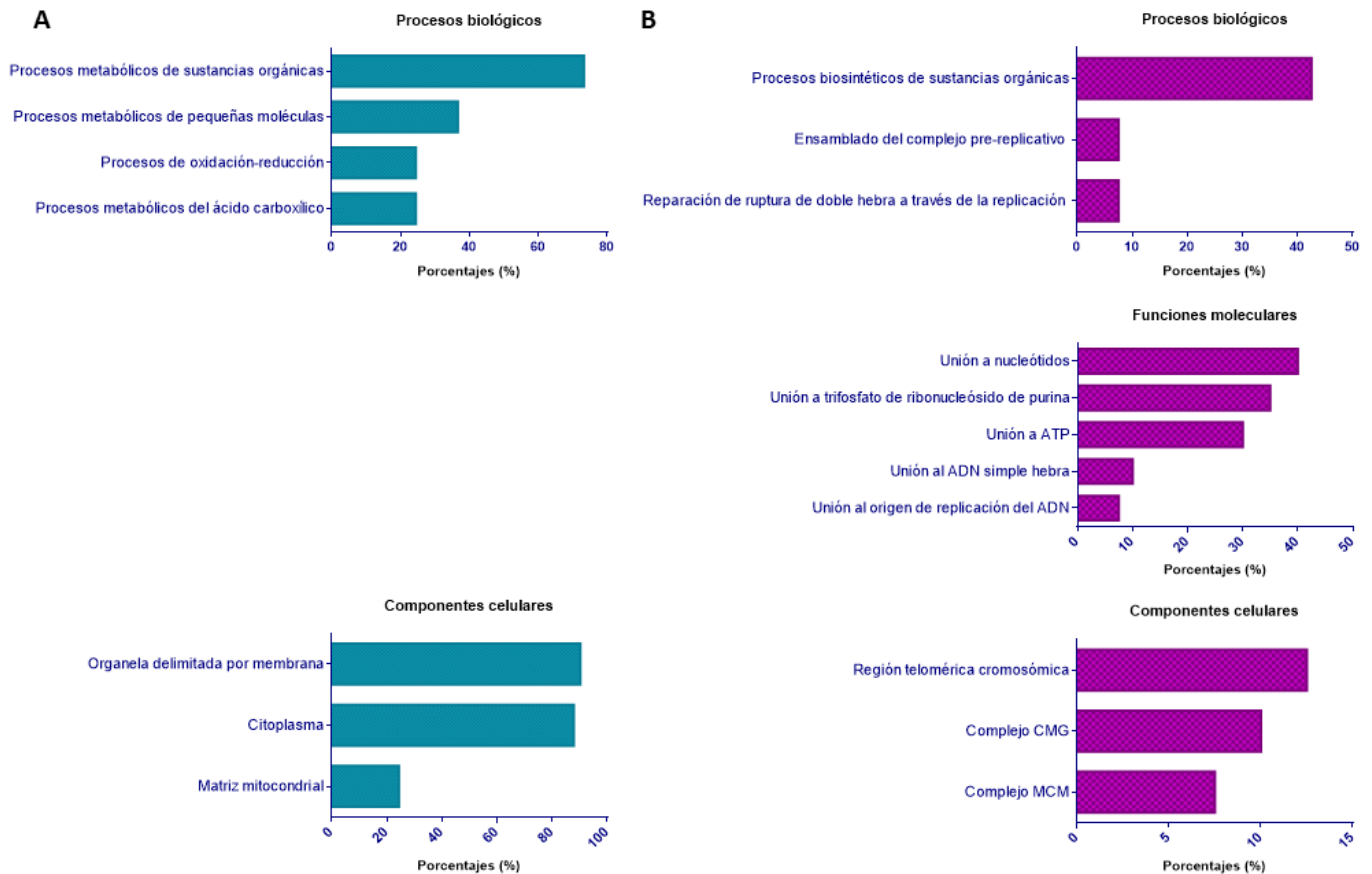


Figura 27. Análisis de enriquecimiento GO de las proteínas sub-expresadas luego del tratamiento con (A) CuHL1 y (B) CuHL2. Los porcentajes de representación de cada categoría fueron determinados como el porcentaje sobre el total de las proteínas diferencialmente expresadas.

Entre las proteínas sobre-expresadas para ambos complejos, se observa que los principales procesos biológicos enriquecidos están relacionados con proteínas *Heat Shock* (HSP) y co-chaperonas: “Respuesta a proteínas no plegadas”, “Respuesta al calor” y “Replegamiento de proteínas dependiente de cofactores de chaperonas”. Las proteínas involucradas en estos procesos son HSPs y co-chaperonas, principalmente de la familia de la HSP70 (HSPA1B, HSPH1, HSPA6, BAG3, DNAJA1 y DNAJB1). Así mismo, ambos complejos presentaron enriquecimiento de funciones moleculares asociadas con HSPs y co-chaperonas.

Las HSPs están involucradas en el plegamiento de proteínas y generalmente se expresan como una reacción al estrés del retículo endoplasmático (RE). Las células cancerosas experimentan un estrés del RE debido a varias características, como la hipoxia, la baja

disponibilidad de nutrientes, el estrés oxidativo y el aumento de la replicación y el metabolismo, las cuales conducen a un aumento en el plegamiento de proteínas y la acumulación de proteínas mal plegadas. En respuesta al estrés del RE, se inicia la respuesta a proteínas no plegadas (UPR, por sus siglas en inglés) [81]. El objetivo principal de la UPR es restablecer la homeostasis del RE aumentando la capacidad de plegamiento de proteínas [82]. Sin embargo, si el estrés del RE es prolongado o agudo, un programa terminal de UPR promueve la muerte celular. En este sentido, muchos cánceres con UPR aumentada pueden ser hipersensibles a compuestos que generan estrés del RE. Los agentes quimioterapéuticos pueden alterar la UPR mediante diferentes mecanismos, como la inhibición de la actividad del proteasoma y generación de estrés oxidativo. En la sección 5.2.1.5 se demostró que CuHL1 y CuHL2 son capaces de inhibir la actividad del proteasoma; y además el análisis proteómico mostró una disminución de la expresión de la subunidad PSMD4 del proteasoma. Por otro lado, en la sección 5.2.1.4 se determinó que ambos complejos inducen un aumento significativo en los niveles de ERO. Estos mecanismos podrían llevar al estrés del RE y la acumulación de proteínas mal plegadas, que podrían explicar la sobreexpresión de las HSPs con ambos complejos.

Al analizar las proteínas reguladas negativamente, se encuentran más diferencias en los términos de GO entre los dos complejos. El único proceso biológico en común es el “Proceso metabólico de sustancias orgánicas”. Luego del tratamiento con CuHL1, las proteínas sub-reguladas fueron enriquecidas en otros procesos metabólicos, como “Procesos metabólicos de pequeñas moléculas”, “Procesos de oxidación-reducción” y “Procesos metabólicos del ácido carboxílico”. En cambio, CuHL2 presenta enriquecimiento en procesos biológicos relacionados a la replicación y reparación del ADN. Los componentes celulares enriquecidos con CuHL2 también se encuentran relacionados al ADN: “Región telomérica cromosómica”, “Complejo CGM” y “Complejo MCM”. La inhibición de procesos relacionados con la replicación del ADN puede ser explicado por la capacidad de CuHL2 de interactuar y generar daño en el ADN.

La base de datos de STRING fue utilizada para realizar un análisis de interacción proteína-proteína (PPI), con el fin de evaluar las interacciones entre las proteínas diferencialmente expresadas en respuesta a los tratamientos con los complejos. En

estas redes, los nodos representan proteínas y los bordes representan las interacciones entre dos proteínas, donde el grosor de la línea indica la fuerza de los datos que avalan esas interacciones. Se utilizó el algoritmo de *clustering* de Markov (MCL) para identificar la formación de *clusters* con interacciones proteína-proteína significativas.

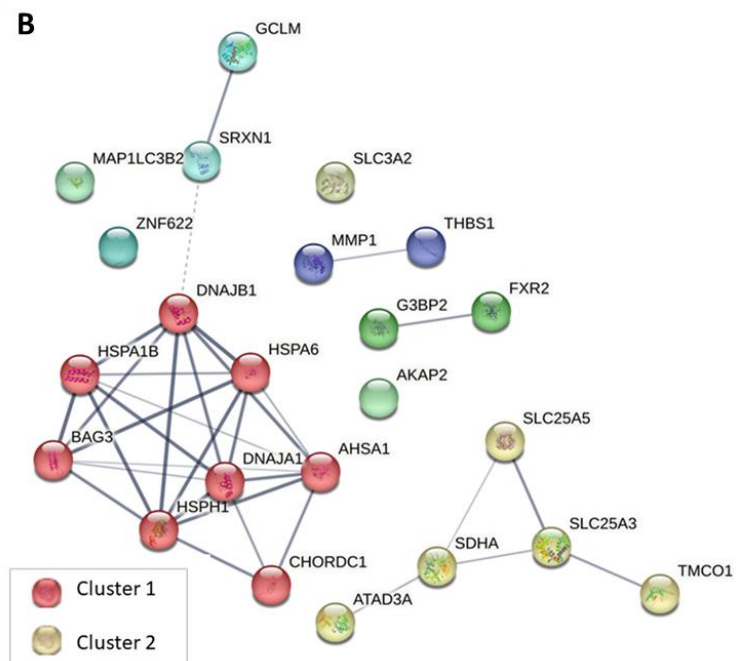
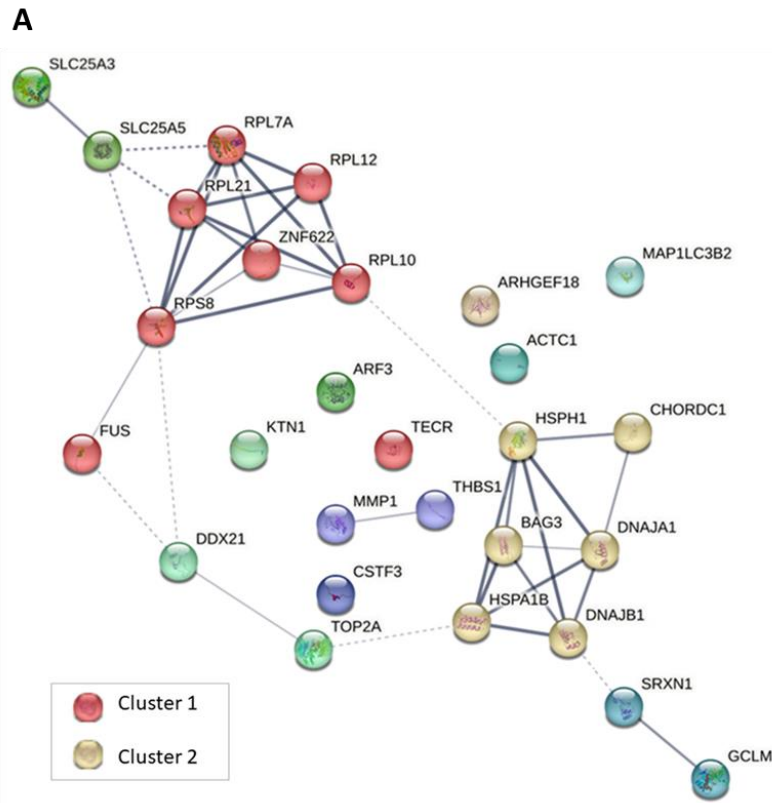
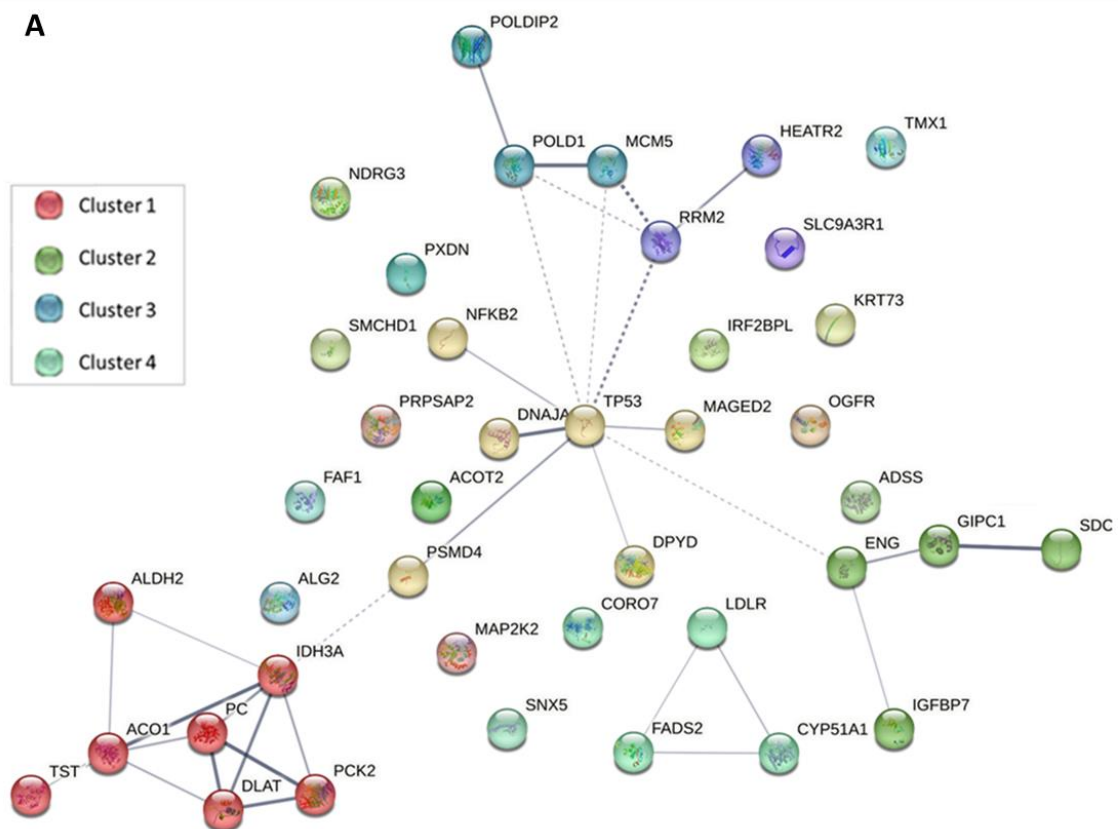


Figura 28. Redes de interacción para proteínas sobre-expresadas en respuesta al tratamiento con (A) CuHL1 y (B) CuHL2, generadas utilizando la base de datos STRING.

La figura 28 muestra las redes generadas para proteínas sobre-expresadas luego del tratamiento con los complejos. En ambas redes se formaron *clusters* de interacción que contienen proteínas HSPs y co-chaperonas: BAG3, CHORDC1, DNAJA1, DNAJB1, HSPA1B y HSPH1 para CuHL1; y AHSA1, BAG3, CHORDC1, DNAJA1, DNAJB1, HSPA1B, HSPA6 y HSPH1 para CuHL2. Estos clusters se correlacionan con los procesos biológicos enriquecidos en el análisis de GO.



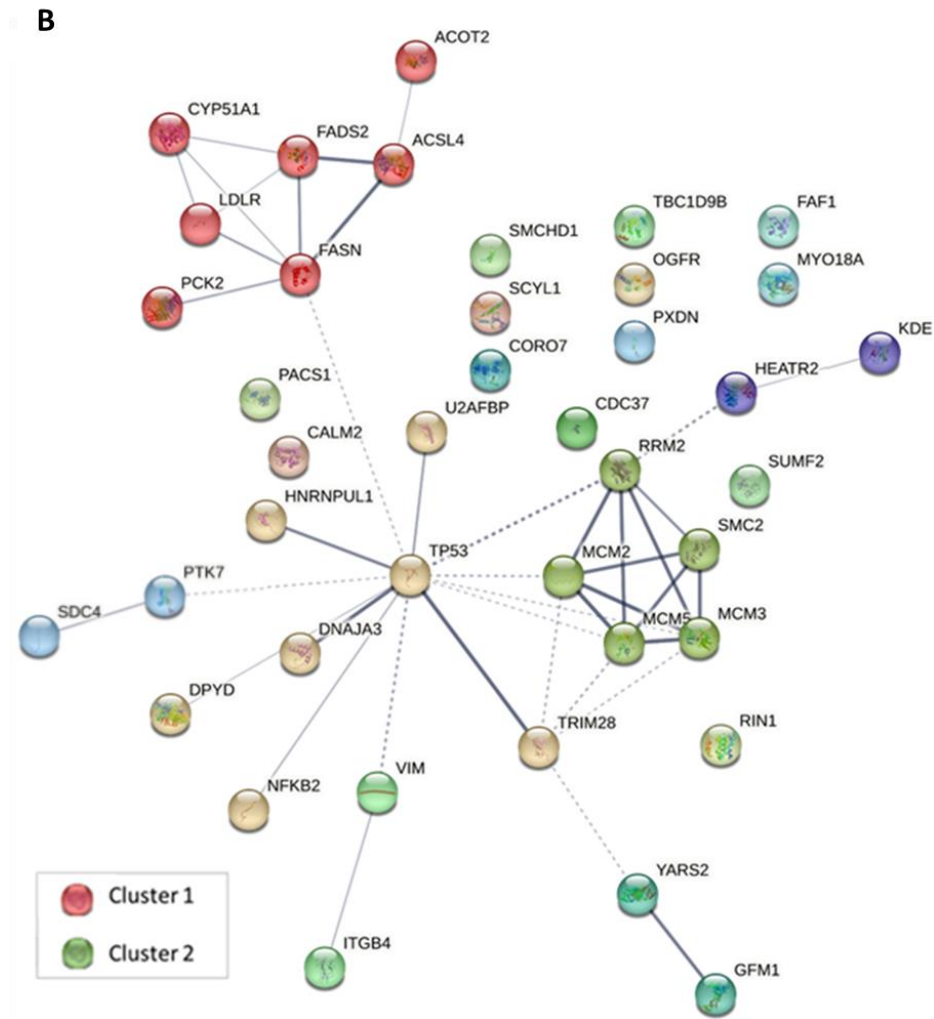


Figura 29. Redes de interacción para proteínas sub-expresadas en respuesta al tratamiento con (A) CuHL1 y (B) CuHL2, generadas utilizando la base de datos STRING.

La figura 29 muestra las redes generadas para proteínas sub-expresadas luego del tratamiento con los complejos. Ambas redes de interacción presentan un nodo central formado por la proteína p53. El gen supresor de tumores TP53 codifica la proteína p53, un factor de transcripción crucial para el control adecuado de la progresión del ciclo celular, la senescencia, la apoptosis, la reparación del ADN y el mantenimiento del genoma, entre otras funciones importantes [83]. El gen TP53 es el objetivo más frecuente de mutación en tumores, mutado en más de la mitad de todos los cánceres, incluyendo el TNBC [84]. Existen mutaciones en TP53 que resultan en una "pérdida de función" que elimina los efectos supresores de tumores de p53. Sin embargo, muchas mutaciones en TP53 son mutaciones de "ganancia de función" (GDF), las cuales pueden adquirir propiedades oncogénicas, aumentando la invasividad, metástasis y recurrencia

del cáncer [85]. En particular, las células MDA-MB-231 presentan una p53 mutante GDF altamente expresada, por lo que la degradación o inhibición de su actividad puede considerarse como un mecanismo terapéutico prometedor [86]. Se ha demostrado que una reducción de p53 mutante puede inducir apoptosis en las células MDA-MB-231 [87]. Por lo tanto, la sub-regulación de p53 mutante es uno de los mecanismos de acción antitumoral más importantes encontrados para CuHL1 y CuHL2.

Otra similitud encontrada entre las dos redes de proteínas sub-expresadas es la presencia de *clusters* relacionados con el metabolismo de lípidos. La red de CuHL1 presenta un *cluster* formado por CYP51A1, FADS2 y LDLR; mientras que la red de CuHL2 presenta un *cluster* formado por ACOT2, ACSL4, CYP51A1, FADS2, FASN, LDLR y PCK2.

La alteración del metabolismo lipídico es un factor reconocido en el metabolismo tumoral. Las células tumorales tienden a aumentar la lipogénesis y la captación y almacenamiento de lípidos [88]. Esta desregulación del metabolismo lipídico ayuda a promover el crecimiento tumoral, la propagación metastásica y la resistencia a la terapia [89]. Se ha reportado la sobre-expresión de enzimas lipogénicas en varios tipos de cáncer, incluyendo el de mama [90]. En consecuencia, se han estudiado las vías del metabolismo lipídico tumoral como un blanco prometedor contra el cáncer.

Una de las proteínas más sub-expresadas luego del tratamiento con CuHL1 fue la Lanosterol 14-alfa-demetilasa (CYP51A1). Esta proteína cataliza uno de los pasos clave en la biosíntesis del colesterol y generalmente se encuentra sobre-expresada en las células tumorales [91]. En este sentido, varios estudios se han centrado en utilizar el metabolismo del colesterol como blanco en el tratamiento para diversos tipos de cáncer [92]. Las estrategias incluyen apuntar a las vías de biosíntesis del colesterol, así como a la captación de esteroides exógenos. Por ejemplo, se demostró que la presencia de un inhibidor de la lanosterol 14-alfa-demetilasa induce la apoptosis en las células cancerosas [93]. Además, ensayos clínicos han demostrado el efecto protector contra el cáncer de mama de fármacos que inhiben la vía del mevalonato, como las estatinas y el zoledronato [94].

La proteómica mostró que el receptor LDLR se encuentra sub-regulado después del tratamiento con ambos complejos en las células MDA-MB-231. Muchas células

tumorales, como las de TNBC, presentan una sobre-expresión de LDLR, lo cual facilita la captación rápida del colesterol y contribuye a la acumulación de componentes lipídicos [95]. Por lo tanto, la sub-expresión o la inhibición de LDLR afecta la captación de colesterol y podría aumentar la eficacia de los fármacos quimioterapéuticos. Gallagher y colaboradores mostraron que la expresión elevada de LDLR y los altos niveles de LDL son significativos para el crecimiento tumoral en cáncer de mama, y que el silenciamiento de LDLR en células TNBC aumenta la muerte celular y reduce el crecimiento de los tumores [96]. También se encuentran sub-expresadas proteínas relacionadas con el metabolismo de los ácidos grasos, tales como la sintasa de ácidos grasos (FASN), la desaturasa de ácidos grasos (FADS2) y la sintasa de ácidos grasos de cadena larga (ACSL4).

En general, la disminución de la expresión de estas proteínas por parte de CuHL1 y CuHL2 podría conducir a una reducción en la síntesis y el metabolismo de lípidos de las células tumorales, lo cual es un efecto novedoso e interesante para un metalofármaco de cobre.

Por otro lado, la red de CuHL1 presenta un *cluster* con proteínas relacionadas también al metabolismo celular, en particular asociadas al ciclo de Krebs y el metabolismo del piruvato. El *cluster* se encuentra formado por las proteínas mitocondriales ACO1, ALDH2, DLAT, IDH3A, PC, PCK2, y TST. Este *cluster* se correlaciona con los procesos metabólicos enriquecidos en el análisis funcional de GO: “Procesos metabólicos de pequeñas moléculas”, “Procesos de oxidación-reducción” y “Procesos metabólicos del ácido carboxílico”.

Otro *cluster* importante en la red de proteínas sub-reguladas con CuHL2 incluye proteínas que participan en la replicación del ADN: MCM2, MCM3, MCM5, RRM2, y SMC2. Estas proteínas son las responsables del enriquecimiento de los términos de GO relacionados con el ADN mencionados anteriormente. A su vez, en este análisis se encontró que CuHL1 también presenta un *cluster* formado con proteínas que participan en la replicación del ADN: MCM5, POLD1, y POLDIP2 y que tendrían relación directa con la acción de CuHL1 sobre el ADN. Con ambos complejos se observa la disminución en la expresión de proteínas de mantenimiento de minicromosomas (MCM). La familia de proteínas MCM desempeña un papel clave en la replicación del ADN en eucariotas. El

complejo MCM es un factor para la replicación del ADN que controla que la replicación ocurra una vez por ciclo celular [97]. La desregulación del complejo MCM se ha asociado con la aparición y progresión de muchos tumores [98]. Además, se ha detectado una sobreexpresión de MCM en diversas células cancerosas, incluido el cáncer de mama [99]. Asimismo, CuHL1 mostró una sub-expresión de POLD1, una ADN polimerasa involucrada en la replicación y la reparación del ADN durante la replicación cromosómica [100]. Las mutaciones en POLD pueden estar asociadas con el desarrollo del cáncer y se ha demostrado que POLD1 puede afectar la progresión del ciclo celular y promover la proliferación de células cancerosas [101]. En el cáncer de mama, los niveles de expresión génica y proteica de POLD1 están elevados [102]. En este sentido, varios estudios informan que la sub-expresión de POLD1 en células de cáncer de mama inhibe la progresión del ciclo celular y la proliferación celular y promueve la apoptosis [103].

Los análisis funcionales y bioinformáticos realizados demostraron modos de acción similares para ambos complejos, lo cual concuerda con los resultados de viabilidad y mecanismos de acción previamente reportados. El tratamiento con CuHL1 y CuHL2 generaron un incremento de proteínas involucradas en el estrés de RE y la UPR, al igual que una disminución de proteínas relacionadas en la replicación y reparación del ADN. Uno de los mecanismos de acción más importantes encontrados para CuHL1 y CuHL2 fue la sub-expresión de la forma mutada de p53 con GDF. Además, se encontró un efecto nunca antes descrito para metalofármacos de cobre, que se relaciona con la sub-expresión de proteínas relacionadas con el metabolismo y la síntesis de lípidos, la cual podría generar una disminución favorable de los niveles lipídicos como potencial mecanismo de acción.

5.2.2 Estudio de la actividad anticancerígena de los complejos sobre modelos 3D

Con el objetivo de seguir estudiando la capacidad antitumoral de estos metalocompuestos, se utilizaron sistemas celulares más complejos, como los esferoides multicelulares y las mamoesferas.

Actualmente, los ensayos de *screening* de drogas antitumorales en cultivo en monocapa (2D) son complementados con el uso de modelos tridimensionales de esferoides tumorales multicelulares (3D), ya que son una mejor representación de los tumores [104]. En comparación con los modelos de cultivo 2D, los modelos 3D representan la complejidad de los tumores sólidos. La organización concéntrica de las células, así como la heterogeneidad metabólica de las células que conforman un esferoide, permite que se reproduzca de manera más precisa el microentorno tumoral, el crecimiento celular, el transporte de oxígeno, nutrientes y metabolitos y también el movimiento de células dentro del mismo esferoide [105].

5.2.2.1 Esferoides multicelulares

Se generaron esferoides multicelulares de las líneas MDA-MB-231 y MCF7 por el método *hanging drop*. Los esferoides fueron expuestos a los dos complejos por un periodo de 48hrs. Luego de la incubación se adicionó resazurina y se procedió a leer la fluorescencia en un espectrofluorómetro.

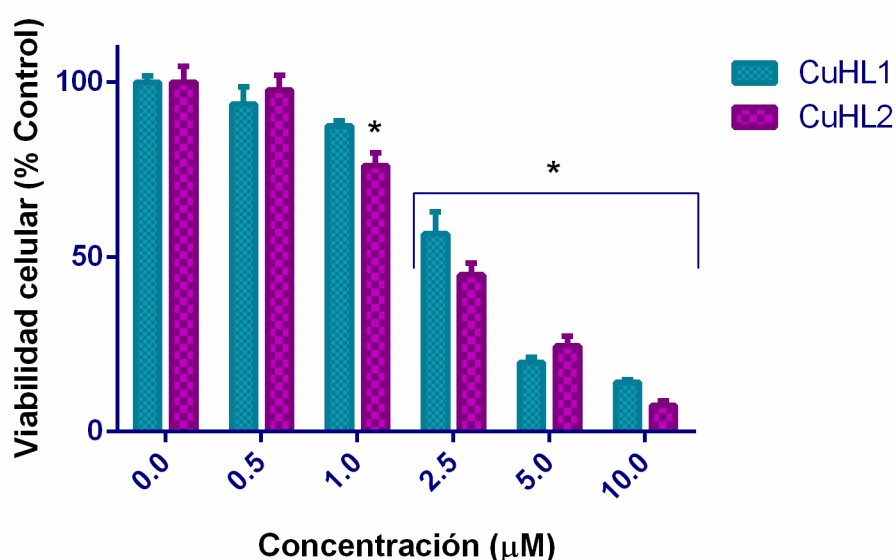


Figura 30. Gráficas de viabilidad celular de los esferoides de la línea MCF7 vs concentración de los complejos. Método Resazurina. Los resultados se expresan como la media \pm SEM (n=18). *Diferencia significativa con el control ($p < 0.05$).

En la figura 30 se puede ver cómo disminuye la viabilidad celular de los esferoides al aumentar la concentración de los complejos. Ambos compuestos presentan actividad citotóxica en un rango de concentraciones micromolar bajo, a partir de 2,5 μM para CuHL1 y 1 μM para CuHL2. Los valores de IC_{50} obtenidos fueron: CuHL1 $2,64 \pm 0,29 \mu\text{M}$; CuHL2 $2,23 \pm 0,30 \mu\text{M}$. Estos valores son similares a los obtenidos en monocapa, lo cual demuestra el gran potencial que podrían tener estos complejos en el tratamiento del cáncer de mama. En general, se observa una disminución en el efecto antitumoral cuando se pasa de un modelo 2D a uno 3D. A este proceso se lo denomina resistencia multicelular (RMC) y puede estar dada por la diferencia en la penetración de la droga y por variaciones dentro del esferoide y en el microambiente (como el pH, hipoxia, matriz extracelular) [106,107].

Además, se analizó el efecto de la droga de referencia CisPt sobre los esferoides de MCF7. El IC_{50} obtenido fue de $129,5 \pm 9,3 \mu\text{M}$, alrededor de 30 veces más alto que el de los complejos de cobre.

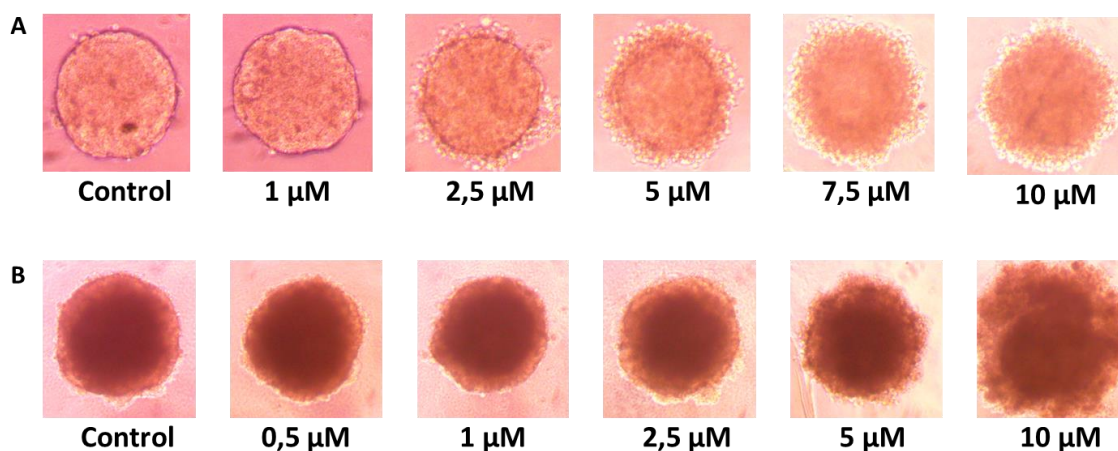


Figura 31. Fotos de esferoides de la línea MCF7 luego del tratamiento con diferentes concentraciones de (A) CuHL1 y (B) CuHL2. Fotografías tomadas con el microscopio óptico Olympus BX50, con un objetivo 40x.

La figura 31 muestra micrografías de los esferoides que fueron tomadas al finalizar el tratamiento. Se puede observar cómo al aumentar la concentración de CuHL1 y CuHL2, se produce una modificación en la forma esférica de los esferoides, disminuye su compactación y se desprenden las células del exterior, alterando el borde externo de los mismos. Esta alteración en la agregación celular sugiere una disminución de las interacciones célula-célula y célula-matriz extracelular.

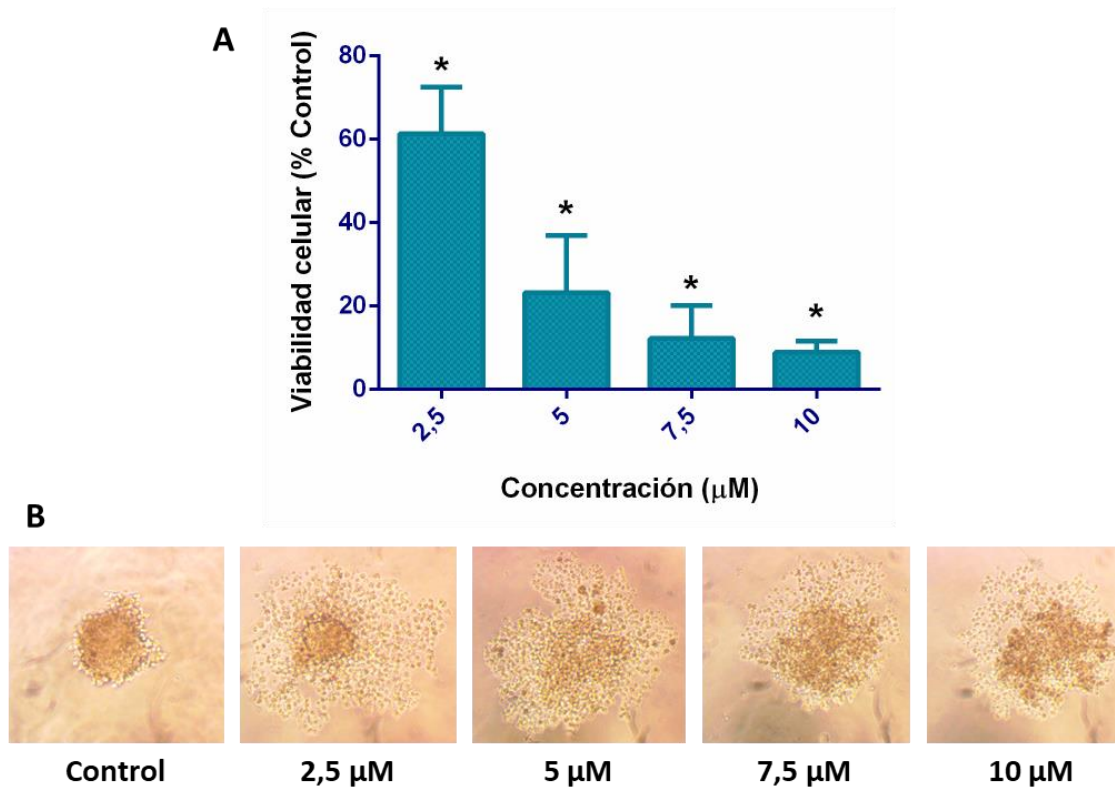


Figura 32. (A) Gráfica de viabilidad celular de los esferoides de la línea MDA-MB-231 vs concentración del complejo CuHL1. Método Resazurina. Los resultados se expresan como la media \pm SEM (n=18). *Diferencia significativa con el control ($p < 0.05$). (B) Fotos de esferoides de la línea MDA-MB-231 luego del tratamiento con diferentes concentraciones de CuHL1. Fotografías tomadas con el microscopio óptico Olympus BX50, con un objetivo 40x.

Por otro lado, en los esferoides de la línea MDA-MB-231 se puede ver el mismo efecto dosis dependiente sobre la viabilidad celular cuando se trata con CuHL1 (Figura 32). Se obtuvo un valor de IC_{50} de $3,11 \pm 0,16 \mu M$. Sin embargo, en las micrografías se observa como la línea MDA-MB-231 no forma esferoides compactos como la línea MCF7, sino agregados celulares sueltos. Muchas líneas tumorales establecen interacciones célula-célula débiles, formando agregados con células menos asociadas estrechamente; lo cual no representa el empaquetamiento compacto del tumor. Esta característica se ha relacionado con la pérdida de expresión de la E-cadherina en la línea MDA-MB-231 [108]. El agregado de aditivos que aumenten la viscosidad, como el Matrigel, ayuda a la formación de esferoides multicelulares compactos [109]. Sin embargo, con el protocolo sin aditivos utilizado sólo se formaron los agregados celulares sueltos. Debido a las complicaciones que trae el manejo de los agregados celulares y las diferencias en

morfología y propiedades de difusión con respecto a los tumores, se decidió no seguir el análisis en los esferoides de MDA-MB-231.

Continuando con los esferoides de la línea MCF7, para analizar el efecto de los complejos sobre la capacidad proliferativa de los esferoides multicelulares, se realizó un ensayo clonogénico a partir de las células de los esferoides tratados. La figura 33 muestra la variación del número de colonias formadas con la concentración de los complejos. El complejo CuHL1 produjo una disminución significativa de la formación de colonias de 5 a 10 μM . En cambio, CuHL2 redujo la formación de colonias a partir de 2,5 μM .

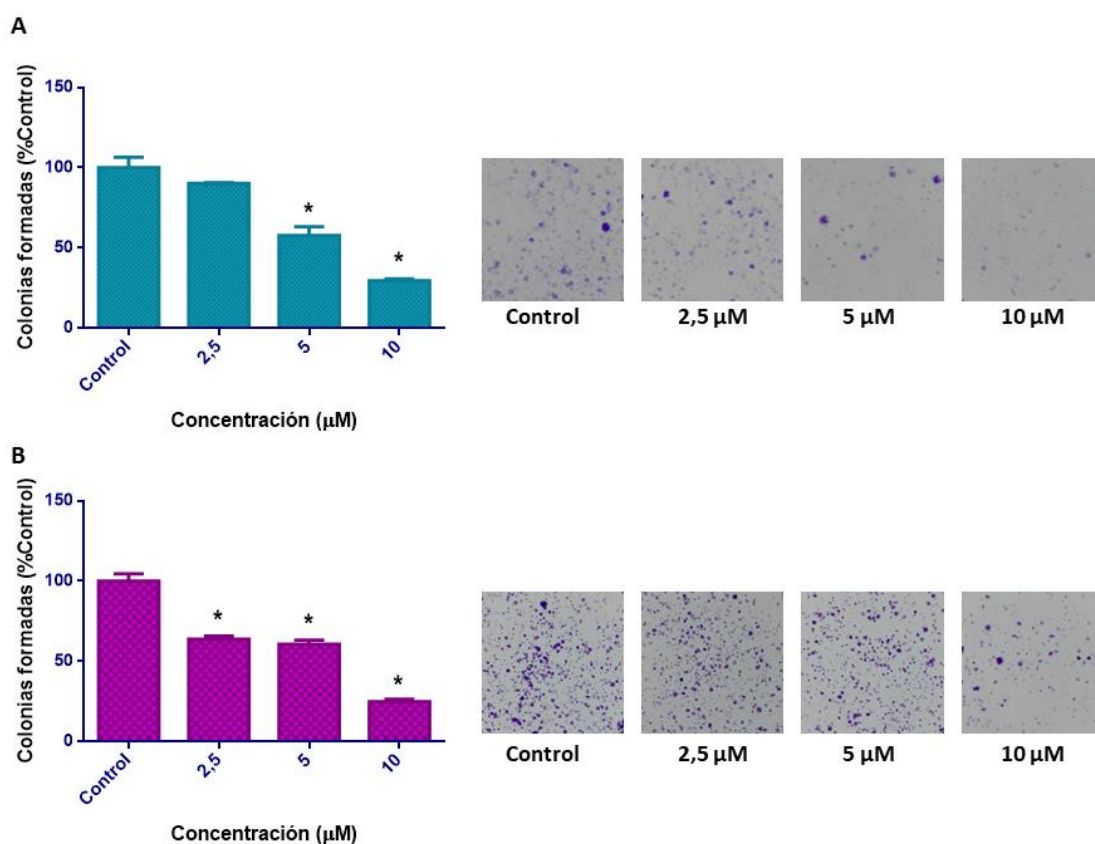


Figura 33. Ensayo clonogénico de esferoides de la línea MCF7 luego de ser tratados con (A) CuHL1 y (B) CuHL2. Los resultados se expresan como la media \pm SEM (n=6). *Diferencia significativa con el control ($p < 0.05$).

Para corroborar la actividad antiproliferativa de los complejos se analizó el efecto del pretratamiento de las células con los complejos en la tasa de crecimiento de los esferoides. Para esto se incubaron durante 24hs una monocapa de MCF7 con diferentes concentraciones de los complejos de cobre. Luego del tratamiento estas células fueron

utilizadas para generar los esferoides multicelulares. Para analizar el efecto antiproliferativo se realizaron medidas de viabilidad y volumen de los esferoides.

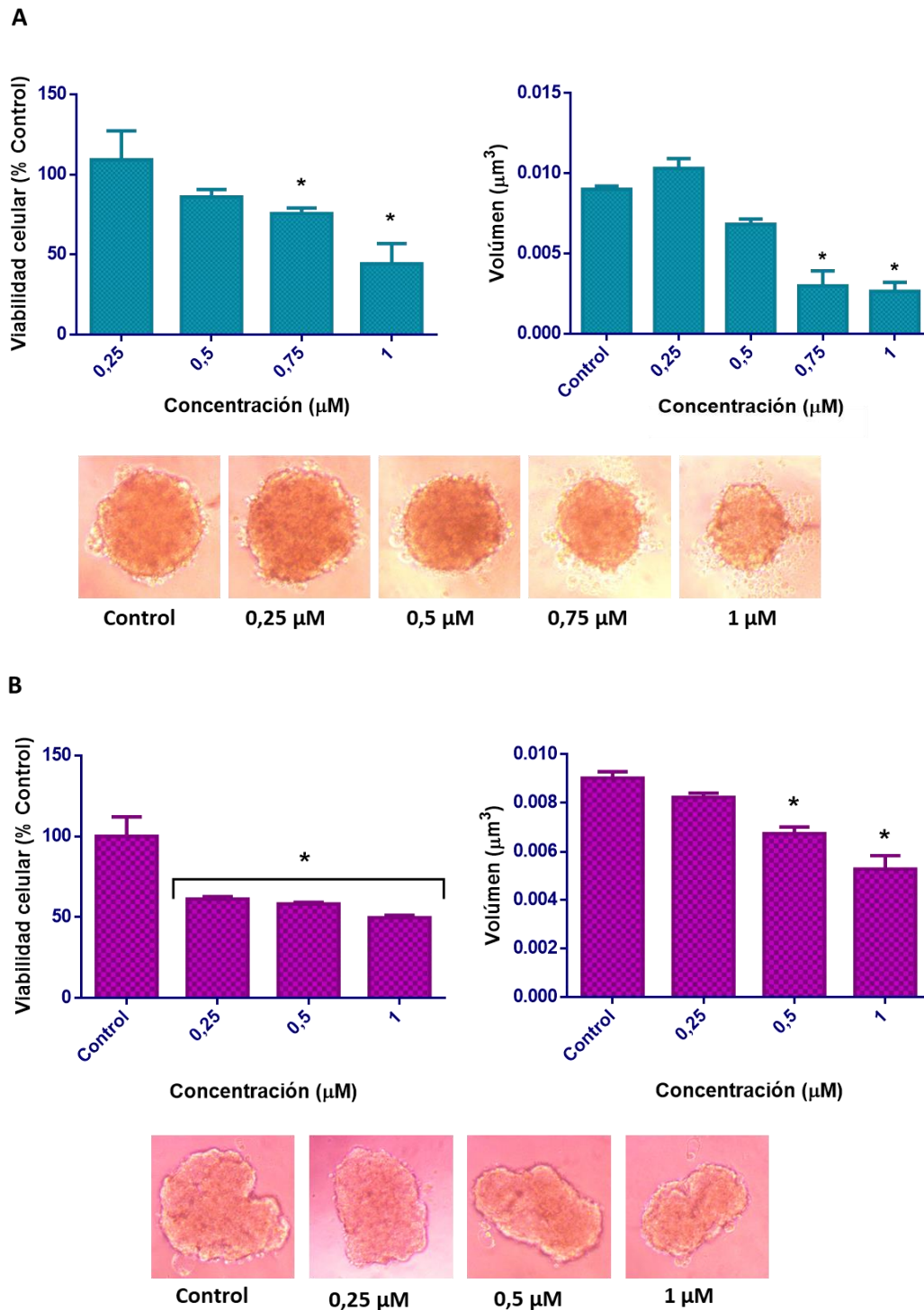


Figura 34. Ensayo de formación de esferoides de la línea MCF7 luego de un pretratamiento en monocapa con (A) CuHL1 y (B) CuHL2. Los resultados se expresan como la media \pm SEM (n=12).

*Diferencia significativa con el control ($p < 0.05$).

En la figura 34(A) se puede ver cómo el pretratamiento con 0,75 y 1 μM CuHL1 produce una disminución en la tasa de crecimiento metabólico de los esferoides, representado como una disminución en la viabilidad celular de los mismos. Así mismo, se observa una disminución en el volumen de los esferoides a las mismas concentraciones de CuHL1.

Cuando se realiza el pretratamiento con CuHL2 (Figura 34(B)) se observa un efecto similar en la tasa de crecimiento de los esferoides, con una disminución de la viabilidad celular acompañada por una baja en el volumen de los mismos.

De esta forma se demostró que ambos complejos tienen efectos antiproliferativos en el modelo de esferoide multicelular de la línea de cáncer de mama MCF7.

5.2.2.2 Mamoesferas

Los tumores son entidades heterogéneas, con diferentes tipos celulares. Un pequeño subconjunto de células, llamadas células madre cancerígenas (CMC), tienen la capacidad de autorrenovación, y diferenciarse generando una población ampliada de progenies más diferenciadas con una capacidad de autorrenovación inferior y un potencial replicativo limitado que conforman el tumor completo [110]. Las CMC presentan una mayor resistencia a los tratamientos de radioterapia y/o quimioterapia. Existen varios mecanismos que pueden contribuir a la resistencia de las CMC, entre ellos se incluyen: el estado de quiescencia en el que se encuentran las CMC que le permite evadir los tratamientos dirigidos a células proliferativas, la sobreactivación de múltiples vías de señalización del desarrollo, la sobreexpresión de proteínas antiapoptóticas combinada con la subexpresión de maquinarias proapoptóticas, y una mayor capacidad para la reparación del ADN. Para obtener resultados duraderos en los tratamientos antitumorales es necesaria la eliminación de las poblaciones tumorales completas, incluyendo las CMC, ya que la incapacidad para hacerlo deja abierta la posibilidad de recurrencia del cáncer [111].

Las CMC pueden ser identificadas a través de su capacidad de crecer como estructuras 3D no adherentes cuando son sembradas clonalmente en un medio libre de suero. Estas estructuras tridimensionales que imitan las características las características de un

tumor mamario se denominan mamoesferas. La capacidad de compuestos de inhibir la formación de mamoesferas es un buen indicador de su efecto sobre las CMC [112].

Para estudiar el efecto de los complejos sobre la capacidad de las células MCF7 de formar mamoesferas, se incubaron las células junto con los complejos en las condiciones necesarias para formar las mamoesferas.

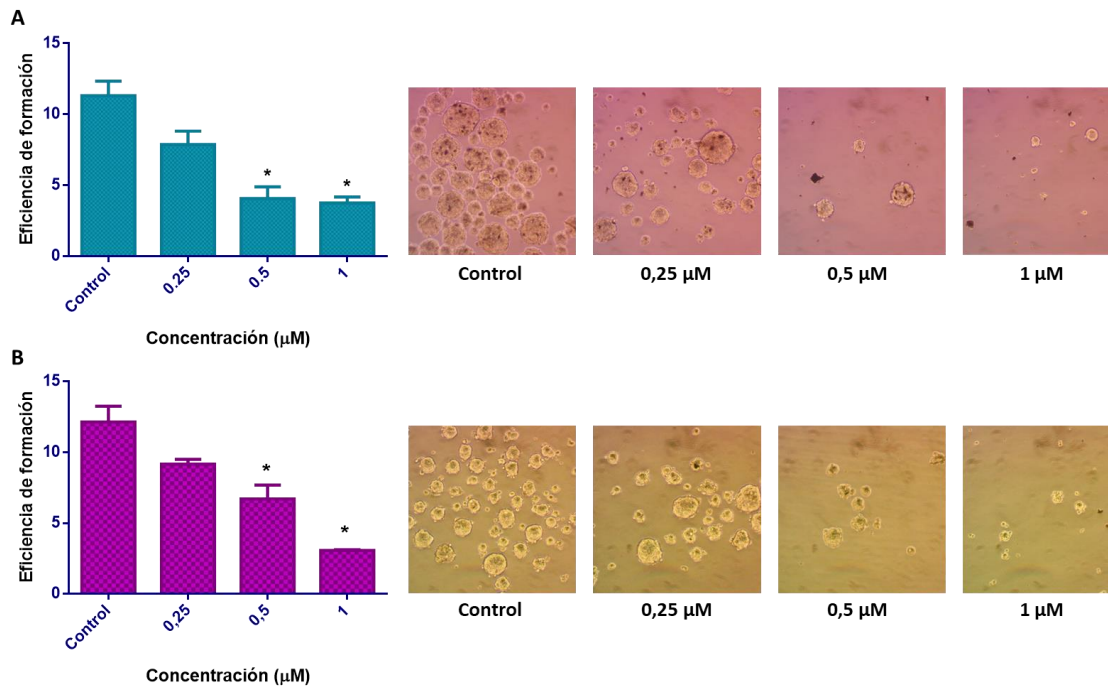


Figura 35. Eficiencia de formación de mamoesferas de la línea MCF7 en presencia de los compuestos (A) CuHL1 Y (B) CuHL2. Los resultados se expresan como la media \pm SEM (n=12). *Diferencia significativa con el control ($p < 0.05$).

En la figura 35 se puede ver cómo ambos complejos disminuyen la eficiencia de formación de mamoesferas, en una forma dependiente de la concentración. CuHL1 reduce la eficiencia de formación de 11,3% en la condición basal a 4,1% y 3,8% en 0,5 y 1 μ M respectivamente. Para CuHL2, la eficiencia se reduce de 12,1% en el control a 6,7% y 3,1% en 0,5 y 1 μ M respectivamente. En las microscopías se observa como el tamaño, al igual que el número de las mamoesferas formadas, se ve notablemente disminuido con el tratamiento con CuHL1 y CuHL2.

Otra forma de identificar las CMC es a través de la expresión de marcadores característicos de la superficie celular. La alta expresión de CD44 y la baja expresión de CD24 ($CD44^{alta}/CD24^{baja}$) es un marcador de CMC en cáncer de mama.

Para comprobar el efecto de los complejos sobre las CMC se analizó la expresión de estos marcadores en las líneas MCF7 y MDA-MB-231 luego de ser tratadas con los complejos. Se utilizó citometría de flujo con los anticuerpos CD44-PE y CD24-FITC. Los *dot plots* obtenidos se encuentran en el anexo.

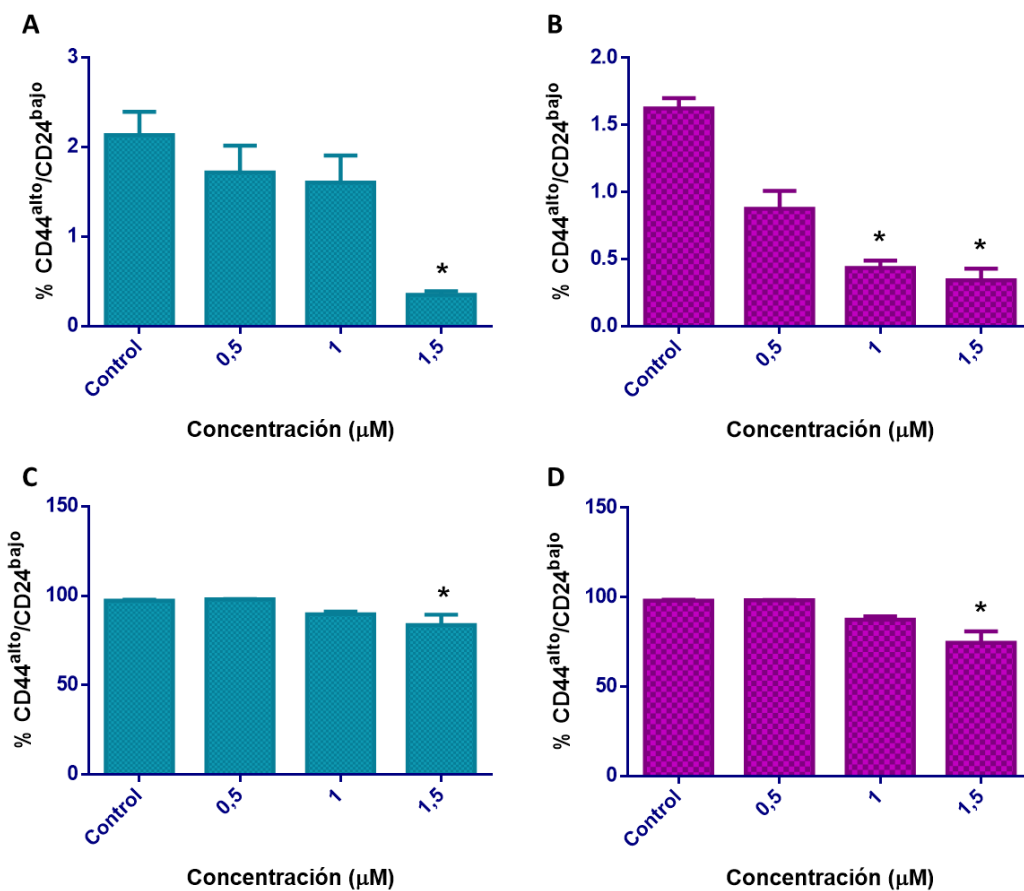


Figura 36. Evaluación de CMCs mediante tinción con los anticuerpos CD24-FITC y CD44-PE. (A) Células MCF7 tratadas con CuHL1; (B) Células MCF7 tratadas con CuHL2; (C) Células MDA-MB-231 tratadas con CuHL1; (D) Células MDA-MB-231 tratadas con CuHL2. Los resultados se expresan como la media \pm SEM (n=6). *Diferencia significativa con el control ($p < 0.05$).

La figura 36 muestra como ambos complejos son capaces de disminuir la población de células $CD44^{alta}/CD24^{baja}$ en las líneas de cáncer de mama. En MCF7, luego del tratamiento con CuHL1 se observa una reducción de CMC de un 2,1% en el control a 0,3

en 1,5 μM . En la misma línea celular, la población de CMC pasa de 1,6% a 0,4 y 0,3% al ser tratada con 1 y 1,5 μM de CuHL2.

Por otro lado, en la línea MDA-MB-231 se observa una disminución en las CMC de 97,1% a 83,6% al tratar las células con 1,5 μM de CuHL1; mientras que cuando se tratan con la misma concentración de CuHL2, las CMC se reducen de 98,1% a 74,6%. Estos resultados comprueban ambos complejos poseen un efecto deletéreo contra las CMC.

Se han reportado varios complejos de Cu(II) que son capaces de afectar a las CMC. Boodram y colaboradores demostraron la actividad antitumoral de una serie de complejos de Cu(II)-fenantrolina que contienen el fármaco antiinflamatorio no esteroideo indometacina. El complejo más efectivo de esta serie mata selectivamente a la línea celular de cáncer de mama HMLER-shEcad, que se encuentra enriquecida en CMC, en comparación con las células HMLER, las cuales presentan una población de CMC disminuida. Además este complejo es capaz de reducir la formación, tamaño y viabilidad de los mamoesferas en mayor medida que la salinomycin, un ionóforo de potasio conocido por inhibir selectivamente las CMC [113].

En el mismo sentido, cuatro complejos de Cu(II) con derivados de la base de Schiff vainillin y el fármaco antiinflamatorio no esteroideo naproxeno fueron sintetizados y caracterizados por Lu y colaboradores. Los complejos presentan actividad anticancerígena frente a línea enriquecida en CMC HMLER-shEcad y son capaces de inhibir la formación de mamoesferas [111].

5.3 CÁNCER DE HUESO

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

5.3.1.1 Viabilidad y proliferación celular

Se evaluó la citotoxicidad de los complejos CuHL1 y CuHL2 mediante el ensayo MTT. La línea de OSA MG-63 fue tratada por un periodo de 24hr. El CisPt fue usado como agente antitumoral de referencia. Los resultados se pueden observar en la tabla 6 y en las gráficas de barra de la figura 37.

Tabla 6: Resultados de IC_{50} (μM) de los complejos CuHL1 y CuHL2, los ligandos H₂L1 y H₂L2, Cu⁺² libre y el CisPt. Los resultados se expresan como la media \pm SEM (n=3).

Compuestos	IC_{50}
CuHL1	$1,98 \pm 0,51 \mu M$
CuHL2	$2,57 \pm 0,30 \mu M$
H ₂ L1	$>100 \mu M$
H ₂ L2	$>100 \mu M$
Cu ⁺²	$>100 \mu M$
CisPt	$39 \pm 1,8 \mu M$

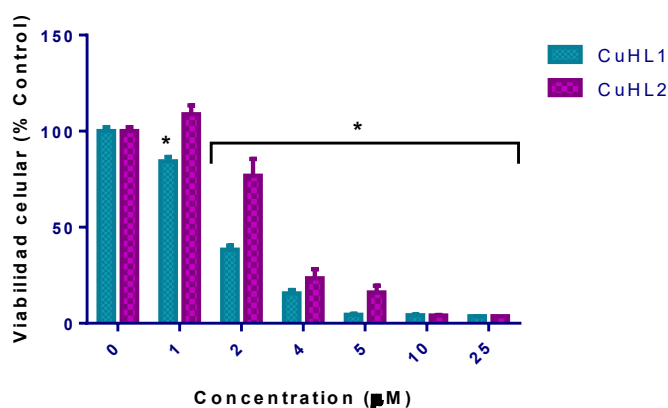


Figura 37. Gráficas de viabilidad celular vs concentración de los complejos. Método MTT. Los resultados se expresan como la media \pm SEM (n=12). *Diferencia significativa con el control (p<0.05).

Los resultados muestran que CuHL1 y CuHL2 disminuyen la viabilidad celular en un rango de concentraciones micromolares bajos. CuHL1 exhibe una actividad antitumoral ligeramente mayor, ya que tiene un IC_{50} de $1,98 \pm 0,51 \mu M$, mientras que el IC_{50} de CuHL2 es de $2,57 \pm 0,30 \mu M$. Además, CuHL1 genera una disminución significativa de la viabilidad a partir de $1 \mu M$, y CuHL2 a partir de $2 \mu M$.

Además, se estudió el efecto de la metalodroga de referencia CisPt sobre la línea MG-63. Se obtuvo un IC_{50} de $39 \pm 1,8 \mu M$, valor que es aproximadamente 20 veces mayor que los obtenidos para los complejos de cobre.

También se analizó el efecto de los ligandos H_2L1 y H_2L2 y del Cu^{+2} libre. En los tres casos, los compuestos no presentaron actividad antitumoral en el rango estudiado ($1-100 \mu M$), obteniendo IC_{50} mayores a $100 \mu M$. Estos resultados nuevamente demuestran la gran importancia que tiene la complejación en la actividad biológica de los compuestos.

Para determinar la especificidad de la actividad citotóxica de los complejos en la línea de OSA, se estudió su citotoxicidad en la línea L929, de fenotipo no tumoral. Los valores de IC_{50} obtenidos fueron de $3,61 \pm 0,32 \mu M$ para CuHL1, y $4,23 \pm 0,04 \mu M$ para CuHL2. En ambos casos los complejos son menos citotóxicos en la línea no tumoral comparada con MG-63, con valores de IS de 1,82 y 1,65 respectivamente.

Por otro lado, el efecto de los complejos sobre el potencial proliferativo de las células MG-63 fue estudiado mediante el ensayo clonogénico. Los resultados se muestran en la figura 38.

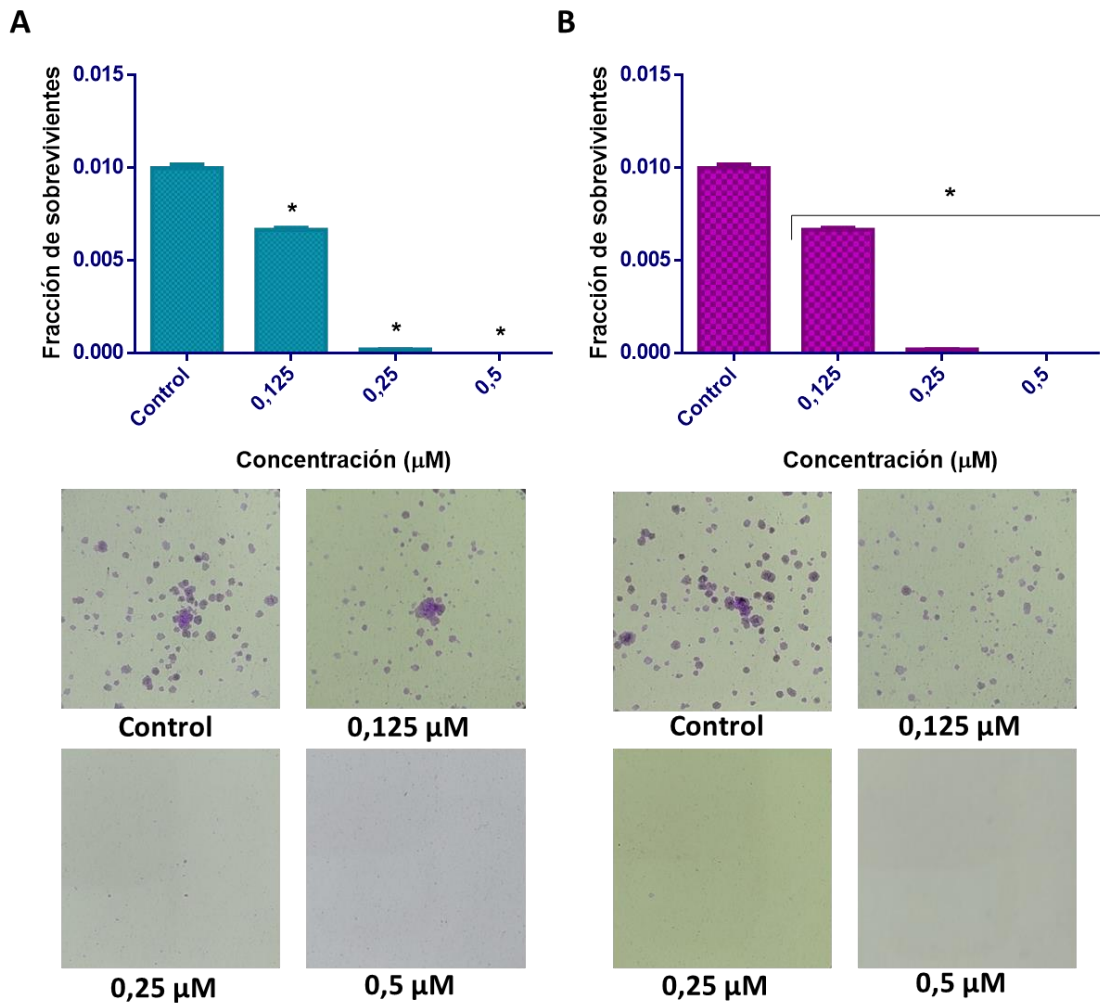


Figura 38. Ensayo Clonogénico en la línea MG-63 con los complejos: (A) CuHL1, (B) CuHL2. Los resultados se expresan como la media \pm SEM (n=6). * Diferencia significativa con el control ($p < 0.05$).

Luego del tratamiento con ambos complejos se observó una inhibición de la proliferación celular, ya que hay una disminución de la fracción de sobrevivientes a partir de 0,125 μ M. Con 0,5 μ M de ambos complejos se inhibe completamente la capacidad de formar colonias. Al igual que en las líneas de cáncer de mama, se observa un efecto deletéreo en la capacidad proliferativa de las células a concentraciones menores a las que detectamos cambios significativos en la viabilidad celular.

Estos resultados corroboran la actividad antitumoral de CuHL1 y CuHL2, ya que son capaces de afectar tanto la viabilidad como la proliferación de las células de OSA.

5.3.1.2 Genotoxicidad

Los efectos genotóxicos de CuHL1 y CuHL2 fueron estudiados, en la línea MG-63, mediante el ensayo cometa. Este método permite estudiar el daño en el ADN en las células, ya que el largo de la cola del cometa (*Tail moment*) representa el nivel de daño en el material genético.

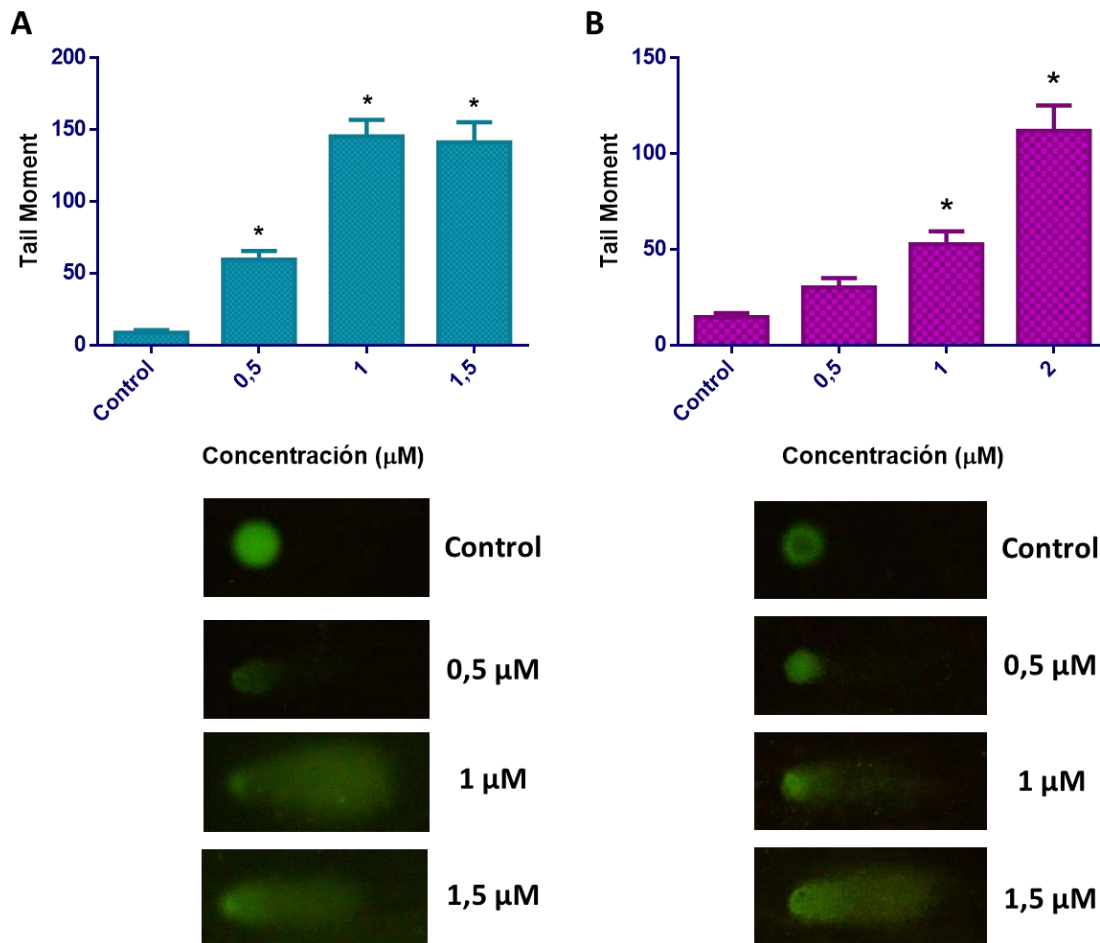


Figura 39. Genotoxicidad en la línea MG-63 de (A) CuHL1, y (B) CuHL2. Los resultados se expresan como la media \pm SEM (n=100). * Diferencia significativa con el control ($p < 0.05$).

En la figura 39 se muestran los gráficos de barra de *tail moment* para ambos complejos, y fotos representativas de los cometas para cada concentración. Se puede observar como a medida que aumenta la concentración de CuHL1 y CuHL2, aumenta el daño del ADN de células y el tamaño de los cometas. Este daño se ve traducido en un aumento significativo del *tail moment* a partir de 0,5 μM para CuHL1 y de 1 μM para CuHL2.

Estos resultados indican que ambos complejos son genotóxicos en la línea de OSA a bajas concentraciones. CuHL1 tiene un mayor efecto citotóxico, con un aumento del daño a menores concentraciones que CuHL2. En la sección 5.2.1.2 se demostró la capacidad de CuHL1 y CuHL2 de interactuar con el ADN de forma intercalante y a través del surco menor. Sin embargo, CuHL1 mostró tener una interacción mayormente intercalante en comparación con CuHL2. Esta diferencia en la interacción podría explicar la mayor actividad genotóxica de CuHL1 que observamos para este tipo de ensayo.

5.3.1.3 Estrés oxidativo

Se estudió la capacidad de los complejo CuHL1 y CuHL2 de generar ERO en la línea MG-63. Se evaluó la generación mediante la oxidación de la sonda DHR-123, luego de un tratamiento por 24hrs.

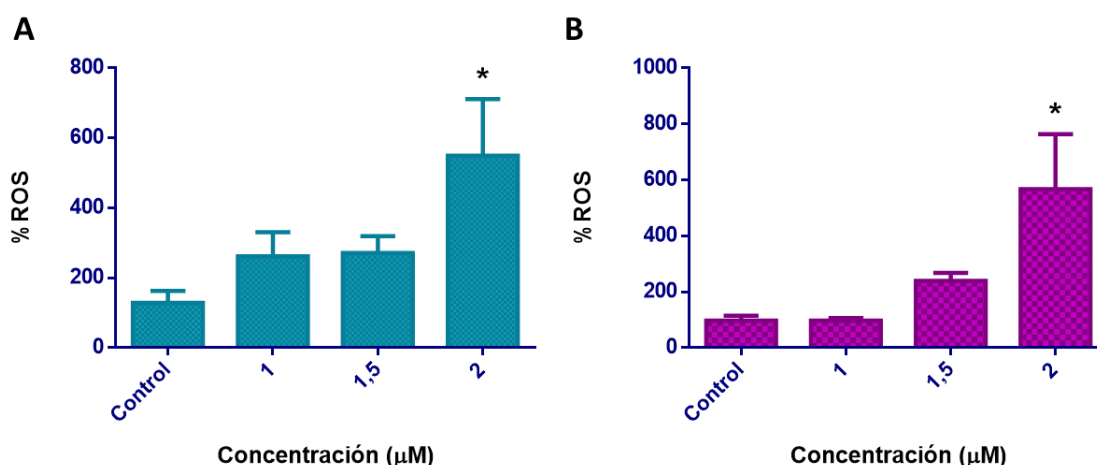


Figura 40. Producción de ERO, luego del tratamiento por 24hrs de la línea MG-63 con (A) CuHL1 y (B) CuHL2. Los resultados se expresan como la media \pm SEM (n=12). * Diferencia significativa con el control (p<0.05).

Los resultados observados en la figura 40 muestran que ambos complejos son capaces de producir un aumento significativo en la producción de ERO. Al tratar las células MG-63 con 2 μM de los compuestos se generan incrementos similares en los niveles de ERO: 450% para CuHL1 y 460% para CuHL2.

Estos resultados sugieren que la producción de ERO podría considerarse como uno de los mecanismos de acción de CuHL1 Y CuHL2 en OSA.

En este sentido, muchos autores han demostrado que los complejos de Cu(II) inducen la muerte celular asociada a la generación de ERO y al agotamiento del glutatión celular (GSH). Cadavid-Vargas y colaboradores reportaron la actividad antitumoral de tres complejos de Cu(II) con sacarina y glutamina en células de OSA MG-63. El mecanismo de acción propuesto para estos complejos se relaciona con la capacidad de inducir la producción de ROS y la reducción de la relación GSH/GSSG [114].

5.3.1.4 Actividad proteasomal

Otro mecanismo de acción reportado para los complejos de cobre es la inhibición del proteasoma. Se estudió el efecto de CuHL1 y CuHL2 sobre la actividad tipo quimiotripsina del proteasoma 20S en extractos de células de la línea MG-63. La figura 41 muestra como la incubación con los complejos produce una inhibición significativa de la actividad proteasomal. CuHL1 redujo la actividad proteasomal a un 52% con 10 μ M. CuHL2, en cambio, inhibió significativamente la actividad proteasomal a partir de 5 μ M. Presenta una actividad del 68% con 5 μ M y 41% con 10 μ M .

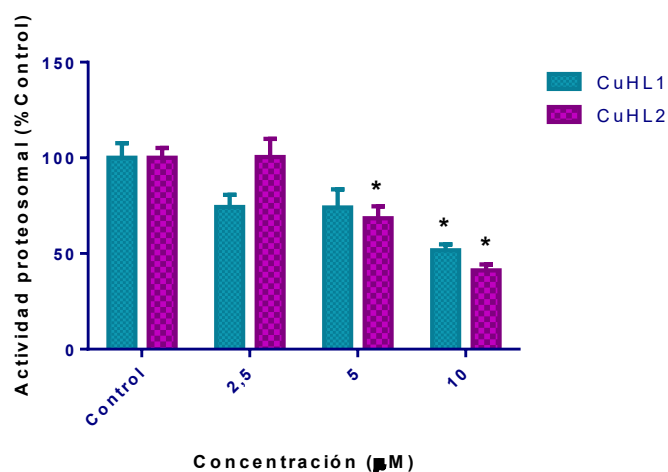


Figura 41. Ensayo de actividad proteasomal en extractos de células MG-63 luego de ser tratadas con los complejos por 2hs. Los resultados se expresan como la media \pm SEM (n=6). * Diferencia significativa con el control ($p < 0.05$).

5.3.1.5 Inducción de Apoptosis

Se estudió la capacidad de los complejos de inducir la muerte celular programada. Para ello se trataron las células MG-63 durante 24 hrs. Este proceso se estudió usando citometría de flujo, mediante el uso de la doble tinción con Anexina V-FITC e ioduro de propidio (IP) como marcadores. Los resultados están representados en la figura 42 con gráficos de barras que muestran las diferentes poblaciones encontradas: células vivas (An-/IP-), células apoptóticas tempranas (An+/IP-), células apoptóticas tardías (An+/IP+) y células necróticas (An-/IP+). Además, en el anexo se pueden observar las tablas con los porcentajes celulares en cada población, así como los *dot plots*.

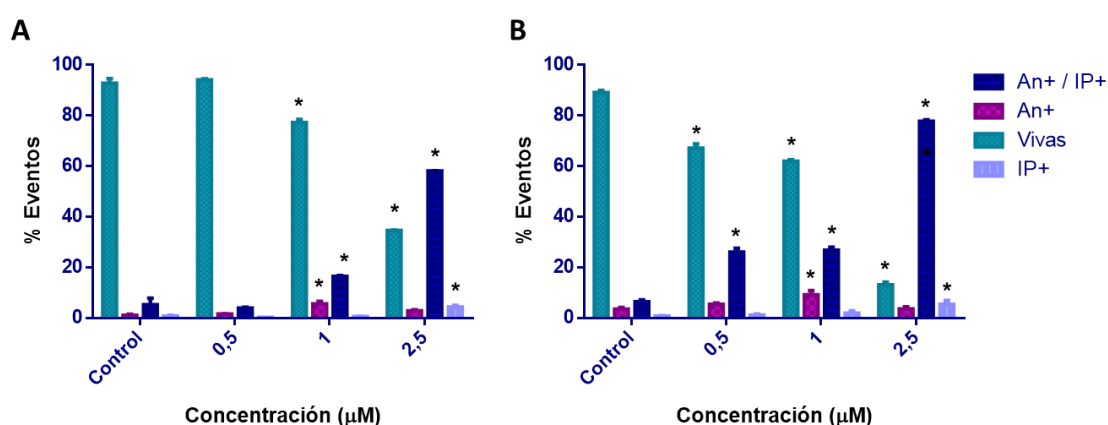


Figura 42. Evaluación de apoptosis mediante tinción con Anexina-FITC e IP. (A) CuHL1, (B) CuHL2. Los resultados se expresan como el promedio \pm SEM (n=12). *Diferencias significativas con el control p<0.05.

En los gráficos se puede ver como CuHL1 y CuHL2 generaron un aumento significativo de las células apoptóticas tempranas en 1 μM. Para CuHL1, las fracciones de células An+/IP- aumentaron considerablemente, pasando de 1,2% (control) a 5,6%; mientras que para CuHL2 esta población aumenta de 3,6% (control) a 9,2%.

En cuanto a la población de células apoptóticas tardías, ambos complejos presentan aumentos significativos dependiente de la concentración. El tratamiento con CuHL1 genera un aumento en la población An+/IP+ de 5,3% en el control, a 16,5% con 1 μM u

a 58,2% con 2,5 μM . CuHL2, en cambio, ya produce un aumento significativo de células apoptóticas tardías con 0,5 μM , pasando de 6,5% a un 26,1%. Asimismo, en 1 μM hay un 26,9% de células An+/IP+, que alcanzan el 77,8% en 2,5 μM .

Además, se observó un aumento significativo de las células necróticas en la concentración más alta, 2,5 μM , de ambos complejos. La población de células An-/IP+ representa el 4,3% para CuHL1 y el 5,5% para CuHL2, frente al 0,8% del control.

Estos resultados están en concordancia con los estudios de citotoxicidad, y sugieren que ambos compuestos son capaces de inducir apoptosis en la línea de OSA MG-63. Estos resultados concuerdan con los estudios de viabilidad celular y proliferación celular, lo que sugiere que este complejo induce apoptosis en células de OSA, dependiendo de su concentración.

5.3.1.6 Estudio de posibles blancos moleculares de CuHL1 y CuHL2

Con el fin de investigar más a fondo los posibles blancos moleculares relacionados con la actividad antitumoral de los complejos en OSA, se llevó a cabo un análisis de cuantificación relativa (LFQ) en extractos de células de la línea MG-63 tratadas con una concentración de 1 μM de los complejos CuHL1 y CuHL2.

El análisis LFQ con LC-MS/MS Orbitrap (Thermo Scientific™) identificó proteínas que se expresan de manera diferencial entre las células tratadas con CuHL1 o CuHL2 y las células no tratadas. Las proteínas encontradas fueron filtradas según el cambio relativo y el p-valor significativo (Figura 43).

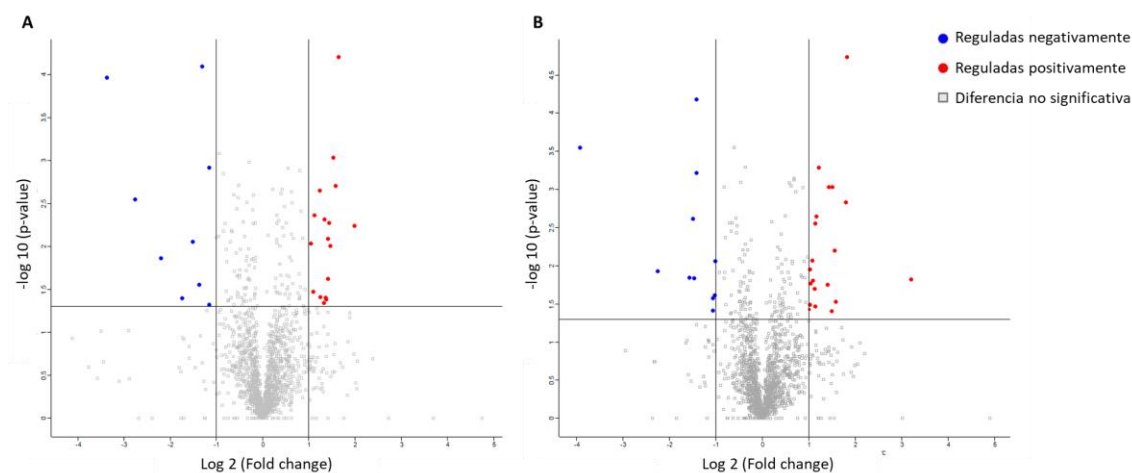


Figura 43. Volcano plots de $\log_{10}(\text{p-valor})$ vs $-\log_2(\text{cambio relativo})$ para las comparaciones de (A) CuHL1 vs Control y (B) CuHL2 vs Control.

De las células tratadas con CuHL1, se identificaron un total de 27 proteínas que se expresaron diferencialmente (sobre o sub) en comparación con el control. Entre éstas, 17 proteínas estaban sobre-expresadas y 10 proteínas estaban sub-expresadas (Tabla 7). A partir de las células tratadas con CuHL2, se identificaron un total de 30 proteínas diferencialmente expresadas en comparación con el control. Entre éstas, 19 estaban sobre-expresadas y 11 estaban sub-expresadas (Tabla 8).

Tabla 7. Proteínas diferencialmente expresadas en células MG-63 tratadas con CuHL1.

Gen	Proteína	Fold-change	p-value
CCNB1	Ciclina-B1 específica de mitosis G2	3,98	0,00573
HSPA1B	Proteína <i>heat shock</i> 70 kDa 1B	3,14	0,00006
DNAJB4	DnaJ homóloga subfamilia B miembro 4	3	0,00197
DNAJB1	DnaJ homóloga subfamilia B miembro 1	2,89	0,00093
CDV3	Proteína CDV3	2,77	0,00978
DDAH1	N(G),N(G)-dimetilarginina dimetilaminohidrolasa 1	2,71	0,00529
BAG3	Regulador de chaperonas 3 de la familia BAG	2,68	0,0082
S100P	Proteína S100-P	2,67	0,02372
CHMP2A	Proteína de cuerpos multivesiculares 2a (Fragmento)	2,59	0,0411
COX5A	Citocromo c oxidasa subunidad 5 ^a	2,58	0,03924
RAB21	Proteína Rab-21 relacionada a Ras	2,54	0,00486

TIGAR	Fructosa-2,6-bifosfatasa	2,5	0,04512
LPCAT1	Lisofosfatidilcolina aciltransferasa 1	2,37	0,03862
CTH	Cistationina gamma-liasa	2,35	0,00223
HSPH1	Proteína <i>heat shock</i> 105 kDa 1B	2,18	0,00435
ATP6V1C1	Protón ATPasa tipo V, subunidad C1	2,14	0,03347
ATP5O	ATP sintasa subunidad O	2,06	0,0093
GFM1	Factor de elongación G, mitocondrial	-10,38	0,00011
AARS2	Alanina-ARNt ligasa, mitocondrial	-6,8	0,00283
RAD23A	Proteína de reparación por excisión UV	-4,6	0,01365
CARS2	Cisteína-ARNt ligasa, mitocondrial	-3,35	0,04015
POLD1	ADN polimerasa	-2,85	0,00887
SDHA	Succinato deshidrogenasa	-2,58	0,02795
CYP51A1	Lanosterol 14-alfa demetilasa	-2,47	0,00008
TXNL1	Proteína tipo tioredoxina	-2,23	0,00122
VPS52	Proteína 52 asociada a la clasificación de proteínas vacuolares	-2,23	0,04784
PKM	Piruvato kinasa	-2	0,00789

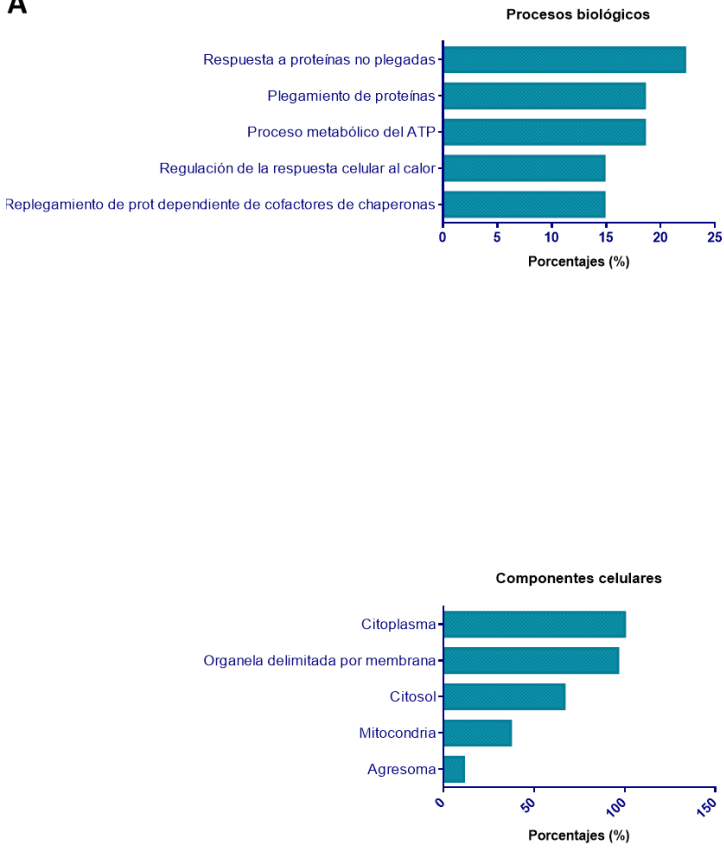
Tabla 8. Proteínas diferencialmente expresadas en células MG-63 tratadas con CuHL2.

Gen	Proteína	Fold-change	p-value
HSPA1B	Proteína <i>heat shock</i> 70 kDa 1B	3,55	0,00002
CCNB1	Ciclina B1 específica de la fase G2/mitosis	3,50	0,00148
WASHC4	Subunidad 4 del complejo WASH	3,01	0,02947
BAG3	Regulador de chaperonas 3 de la familia BAG	2,95	0,00628
DNAJB4	DnaJ homóloga subfamilia B miembro 4	2,84	0,00094
USP47	Ubiquitina carboxil-terminal hidrolasa 47	2,81	0,03926
HSPH1	Proteína <i>heat shock</i> 105 kDa 1B	2,70	0,00092
CASP8	Caspasa 8	2,64	0,01757
ATP5PB	ATP sintasa subunidad B1	2,32	0,00052
CTH	Cistationina gamma-liasa	2,25	0,00227
SLC27A2	Sintasa de aCl-CoA de cadena larga	2,21	0,03426
CDV3	Proteína CDV3	2,20	0,00282
DNAJB1	DnaJ homóloga subfamilia B miembro 1	2,19	0,02005

ATP5F1C	ATP sintasa subunidad O	2,13	0,01573
ATP5O	ATP sintasa subunidad O	2,10	0,00855
DDB2	Proteína 2 de unión a daño del ADN	2,06	0,01719
ATP5MF- PTCD1	Lectura continua de ATP5MF-PTCD1.	2,04	0,01108
TIGAR	Fructosa-2,6-bifosfatasa	2,03	0,03234
MINPP1	Fosfatasa de polifosfato de inositol múltiple.	2,03	0,03739
GFM1	Factor de elongación G, mitocondrial	-15,22	0,00028
AARS2	Alanina-tARN ligasa, mitocondrial	-4,76	0,01167
IVD	Isovaleril-CoA deshidrogenasa	-2,96	0,01431
DHFR	Dihidrofolato reductasa	-2,82	0,00243
ACSF3	Malonato-CoA ligasa	-2,77	0,01462
TXNL1	Proteína tipo tioredoxina	-2,68	0,00007
SDHA	Succinato deshidrogenasa	-2,66	0,00060
TUBB2B	Beta tubulina cadena 2B	-2,09	0,02646
POLD2	ADN polimerasa	-2,09	0,03844
MPI	Manosa-6-fosfato isomerasa	-2,03	0,02428
NADK2	NAD quinasa 2	-2,02	0,00865

Para comprender mejor las características biológicas de las proteínas diferencialmente expresadas, se utilizaron un conjunto de herramientas bioinformáticas. En primer lugar, se utilizó el análisis de enriquecimiento de STRING para analizar si hay enriquecimiento de alguna de las categorías de *Gene Ontology* (GO). Las figuras 44 y 45 muestran los términos GO que se encuentran estadísticamente sobrerrepresentados (valor $p \leq 0,05$ después de la corrección de Benjamini). En el anexo se encuentran las tablas con información detallada de cada categoría.

A



B

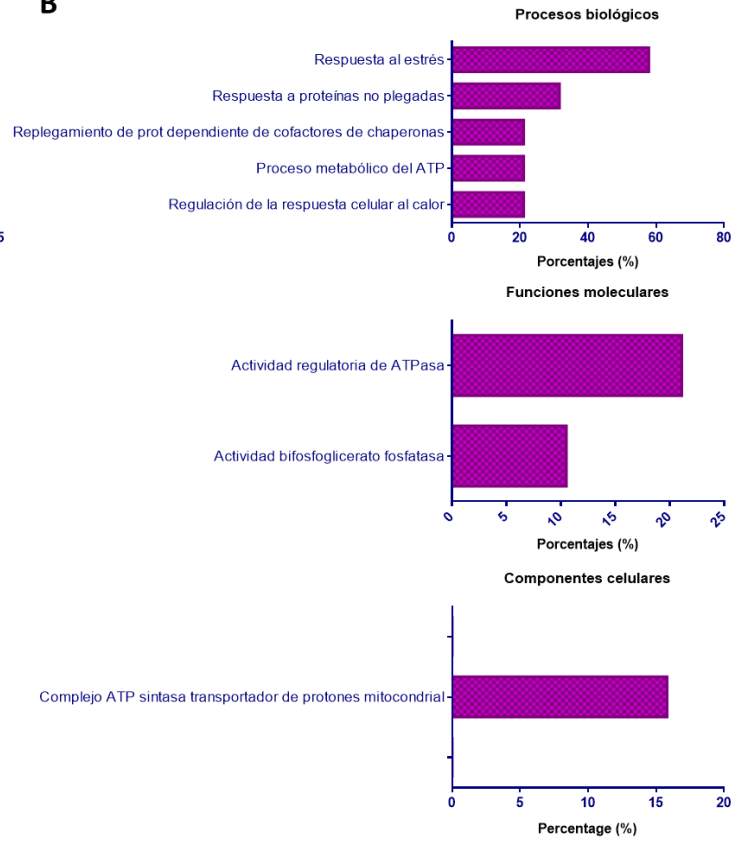


Figura 44. Análisis de enriquecimiento GO de las proteínas sobre-expresadas luego del tratamiento con (A) CuHL1 y (B) CuHL2. Los porcentajes de representación de cada categoría fueron determinados como el porcentaje sobre el total de las proteínas diferencialmente expresadas.

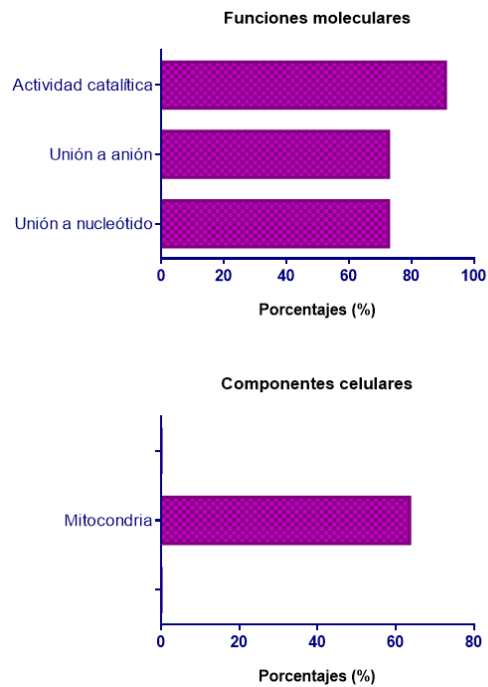


Figura 45. Análisis de enriquecimiento GO de las proteínas sub-expresadas luego del tratamiento con CuHL2. Los porcentajes de representación de cada categoría fueron determinados como el porcentaje sobre el total de las proteínas diferencialmente expresadas.

Al analizar las proteínas sobre-expresadas en ambos complejos, se observa que los principales procesos biológicos enriquecidos están relacionados con las proteínas de choque térmico (HSP) y co-chaperonas. Estos procesos incluyen la "Respuesta a proteínas mal plegadas", la "Regulación de la respuesta al estrés por calor" y el "Replegamiento de proteínas dependiente de co-chaperonas". Las proteínas involucradas en estos procesos son principalmente de la familia de HSP70 (HSPA1B, HSPH1, BAG3, DNAJA1 y DNAJB1). Al igual que en los resultados en cáncer de mama, este incremento de la expresión de las HSPs puede ser explicado por la generación de estrés del RE que lleva a la UPR. En los estudios anteriores se demostró que ambos complejos son capaces de producir ERO e inhibir la actividad proteasomal, dos procesos relacionados con la generación de estrés del RE [115]. Además, dentro de los componentes celulares enriquecidos por CuHL1 se encuentra el agrosoma. Estas estructuras son agregaciones de proteínas mal plegadas que se forman como consecuencia del estrés del RE [116].

Otro proceso biológico en común que se encuentra en las proteínas sobre-reguladas es el de "Procesos metabólicos del ATP". Las proteínas involucradas en este proceso incluyen las subunidades de la ATP sintasa: ATP5O, ATP6V1C1, ATP5C1 y ATP5F1.

En cuanto a las proteínas sub-reguladas, CuHL1 no presentó enriquecimiento en ninguna de las categorías de GO. CuHL2 muestra una disminución de proteínas mitocondrial, las cuales representan más del 60% de las proteínas sub-reguladas por este complejo.

Se utilizó la base de datos STRING para llevar a cabo un análisis de interacción proteína-proteína (PPI), con el objetivo de evaluar las interacciones entre las proteínas expresadas de manera diferencial en respuesta a los tratamientos con los complejos. En estas redes, los nodos representan proteínas y los bordes representan las interacciones entre dos proteínas, siendo el grosor de la línea indicativo de la fuerza de los datos respaldando dichas interacciones. Se empleó el algoritmo de *clustering* de Markov (MCL)

para identificar la formación de grupos con interacciones proteína-proteína significativas.

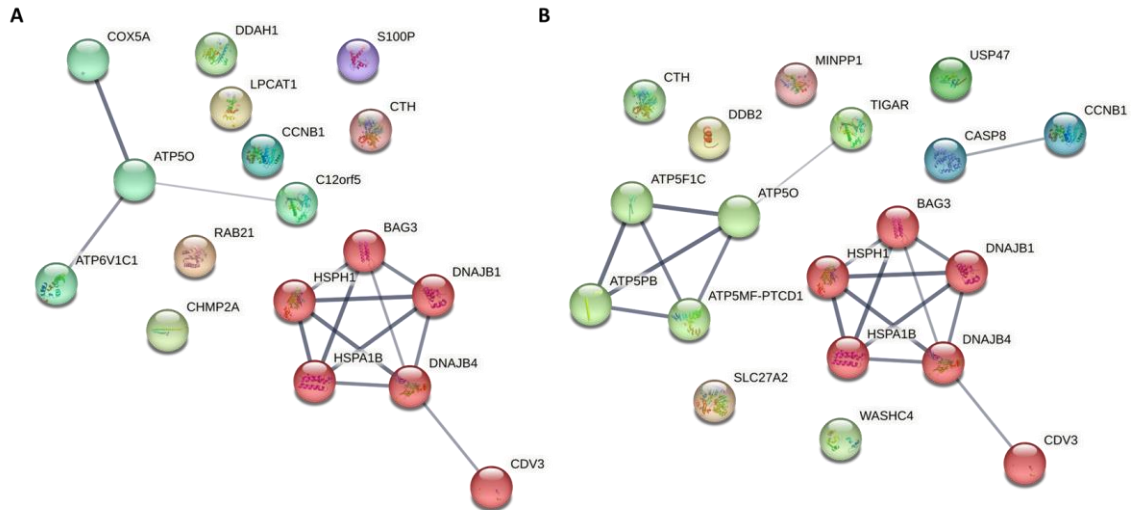


Figura 46. Redes de interacción para proteínas sobre-expresadas en respuesta al tratamiento con (A) CuHL1 y (B) CuHL2, generadas utilizando la base de datos STRING.

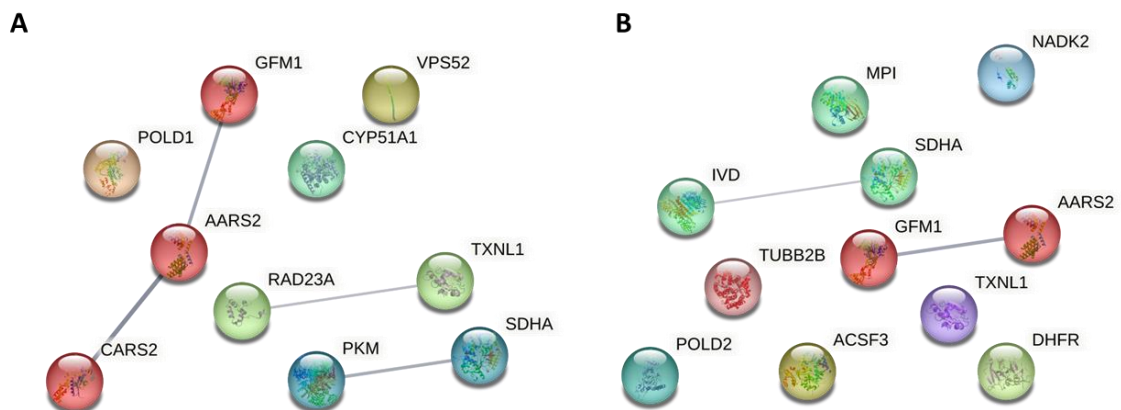


Figura 47. Redes de interacción para proteínas sub-expresadas en respuesta al tratamiento con (A) CuHL1 y (B) CuHL2, generadas utilizando la base de datos STRING.

La figura 46 muestra las redes generadas para proteínas sobre-expresadas luego del tratamiento con los complejos. En ambas redes se formaron importantes *clusters* de interacción con proteínas HSPs y co-chaperonas: BAG3, DNAJB1, DNAJB4, HSPA1B,

HSPH1 y CDV3. Estos *clusters* se correlacionan con los procesos biológicos enriquecidos en el análisis de GO relacionados con el estrés del RE y la UPR.

A su vez, se observan en ambas redes *clusters* relacionados con la cadena transportadora de electrones mitocondrial y la síntesis de ATP. En estos *clusters* encontramos subunidades de la ATP sintasa, como ATP5O, ATP6V1C1, ATP5C1 y ATP5F1, y la citocromo c oxidasa. Las mitocondrias participan en las vías metabólicas y biosintéticas que impulsan el desarrollo y la progresión del cáncer. Además de la producción de energía, controlan muchos parámetros vitales en las células tumorales, como la formación de ERO, los niveles de calcio citosólico y finalmente, el inicio de la apoptosis. La ATP sintasa desempeña un papel crítico en estos eventos mitocondriales y sus adaptaciones en el cáncer, al afectar el metabolismo del cáncer, la homeostasis del calcio y la formación de ERO. Además, esta enzima participa a través de sus funciones en diferentes aspectos del crecimiento tumoral. La actividad de la ATP sintasa se correlaciona en diferentes modelos de cáncer con la progresión tumoral, la proliferación y el comportamiento metastásico [117]. Sin embargo, la ATP sintasa juega un rol importante en la inducción de la apoptosis. En las células tumorales, se ha demostrado que la inhibición de la ATP sintasa retrasa la liberación de citocromo c de las mitocondrias al prevenir la producción de ERO, una cascada de muerte celular que es inducida por el tratamiento con estaurosporina [118]. Se cree que la ATP sintasa es un componente principal del poro de transición de permeabilidad mitocondrial (PTP). PTP es un efector clave en las vías mitocondriales que conducen a la muerte celular. La activación del PTP es estimulada por el calcio, ácidos grasos libres y ROS [119].

La figura 47 muestra las redes generadas para proteínas sub-expresadas luego del tratamiento con los complejos. No se observan la presencia de *clusters* significativos en estas redes.

5.3.2 Estudio de la actividad anticancerígena de los complejos sobre esferoides multicelulares

Para seguir estudiando la capacidad antitumoral de estos complejos de cobre, se utilizaron esferoides multicelulares, los cuales son un modelo tridimensional, que

representa en mayor medida la complejidad de los tumores sólidos. Se generaron esferoides multicelulares de la línea MG-63 por el método *hanging drop*. Los esferoides fueron expuestos a los dos complejos por un periodo de 48hrs. Luego de la incubación se adicionó resazurina y se procedió a leer la fluorescencia en un espectrofluorómetro.

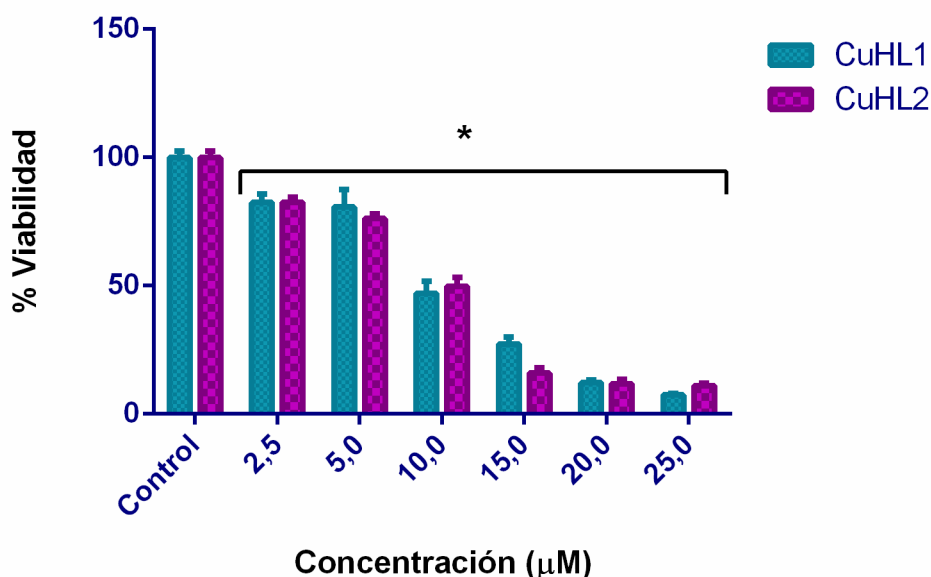


Figura 48. Gráfica de viabilidad celular de los esferoides de la línea MG-63 vs concentración de los complejos. Método Resazurina. Los resultados se expresan como la media \pm SEM (n=18). *Diferencia significativa con el control ($p < 0.05$).

La figura 48 muestra cómo varía la viabilidad celular con la concentración de CuHL1 y CuHL2. Con ambos complejos la viabilidad celular de los esferoides disminuye significativamente al aumentar la concentración. Los dos complejos presentan actividad antitumoral en todo el rango de concentraciones analizadas (2,5-25 µM). Los valores de IC_{50} obtenidos fueron: CuHL1 $9,05 \pm 1,00$ µM; CuHL2 $9,93 \pm 1,42$ µM. Estos valores son aproximadamente 4 veces mayores a los obtenidos en monocapa. Esta diferencia entre los modelos 2D y 3D se puede deber a la resistencia multicelular. Los esferoides suelen presentar mayor resistencia a los compuestos antiproliferativos debido a una menor penetración de las drogas y a variaciones en el microambiente dentro del esferoide, como el pH, la hipoxia y la matriz extracelular [120]. De manera similar a los tumores *in vivo*, la región hipóxica dentro del esferoide reduce la tasa de división celular, lo que disminuye los efectos antiproliferativos de compuestos como el CisPt [63]. 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.

También se estudió el efecto del CisPt sobre los esferoides de MG-63. El IC₅₀ calculado para esta droga de referencia es de $65,1 \pm 5,6 \mu\text{M}$, 7 veces más alto que el de los complejos de cobre.

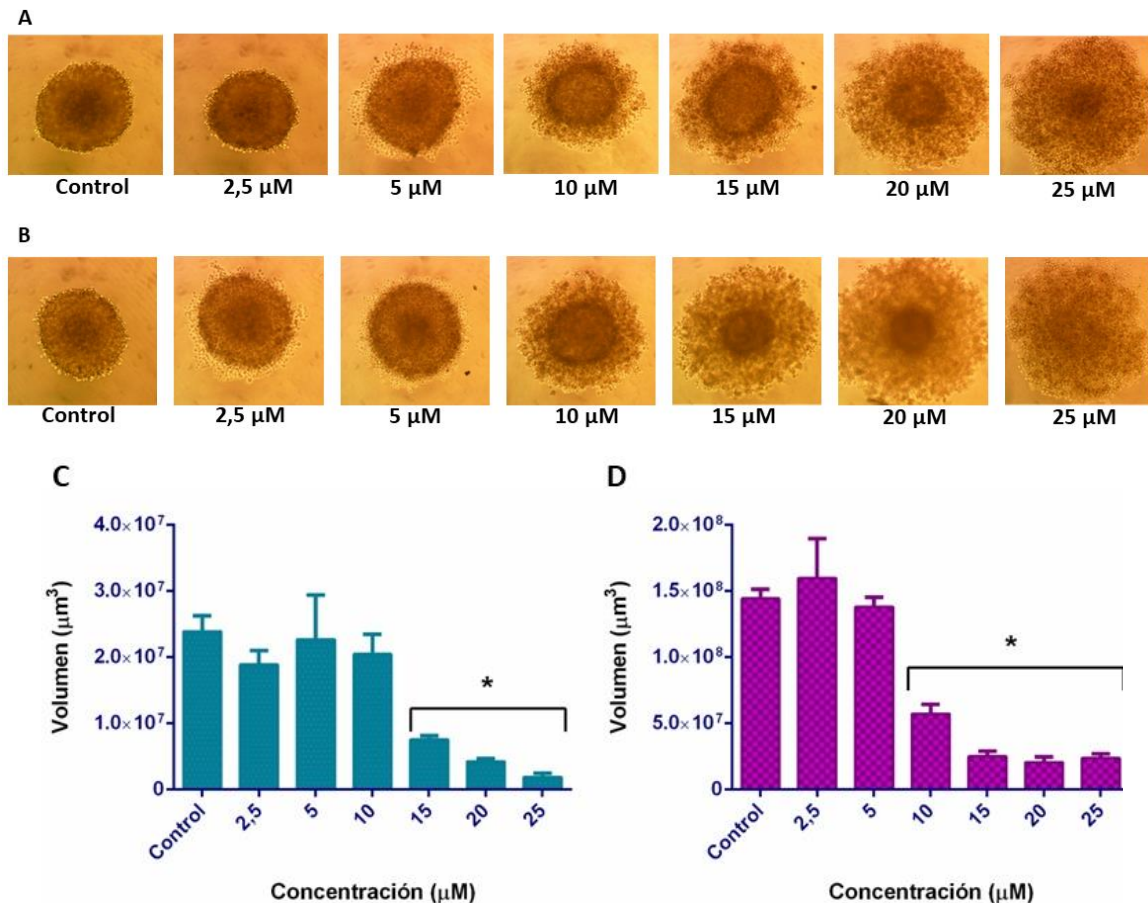


Figura 49. Fotos de esferoides de la línea MG-63 luego del tratamiento con diferentes concentraciones de (A) CuHL1 y (B) CuHL2. Fotografías tomadas con el microscopio óptico Olympus BX50, con un objetivo 40x. Volumen de los esferoides luego del tratamiento con (C) CuHL1 y (D) CuHL2. Los resultados se expresan como la media \pm SEM (n=18). *Diferencia significativa con el control ($p < 0.05$).

La figura 49 muestra micrografías de los esferoides que fueron tomadas al finalizar el tratamiento. Se puede observar cómo al aumentar la concentración de CuHL1 y CuHL2, se produce una modificación en la forma esférica de los esferoides, disminuye su compactación y se desprenden las células del exterior, alterando el borde externo de los mismos. Adicionalmente, se calculó el volumen de los esferoides al finalizar la

incubación con los complejos (Figura 49 C y D). Ambos complejos producen una disminución en el volumen de los esferoides, CuHL1 a partir de 15 μM , mientras que CuHL2 a partir de 10 μM .

5.3.3 Estudio del efecto de CuHL1 en un modelo *in vivo*

Si bien el estudio *in vitro* del accionar antitumoral de compuestos antitumorales suele brindar información valiosa vinculada a sensibilidad y mecanismos de acción asociados, es importante poder estudiar el papel de los mismos en un contexto *in vivo*. Los modelos animales permiten reproducir de manera más certera las características genéticas e histopatológicas de los tumores, así como también reproducir la heterogeneidad y el microambiente tumoral, siendo más ventajosos y relevantes que los modelos *in vitro* [121].

Teniendo en cuenta los resultados *in vitro* expuestos anteriormente sobre células de OSA, se decidió continuar con la evaluación *in vivo* de la actividad antitumoral de CuHL1. Este complejo presenta un menor valor de IC_{50} que CuHL2, 1,98 μM frente a 2,57 μM ; y a su vez, CuHL1 tiene un mejor valor de IS, lo que podría implicar una menor toxicidad.

Para realizar el estudio *in vivo*, se generaron xenotrasplantes de la línea de OSA humano MG-63 en ratones atímicos N:NIH(S) $\text{Fox1}^{\text{nu/nu}}$. El tratamiento consistió en 3 dosis semanales de CuHL1 de 2 mg/kg/día i.p. durante 30 días (Figura 50).

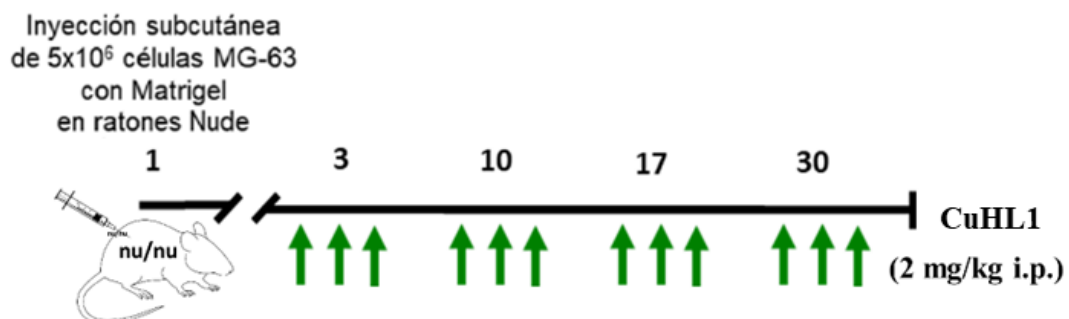


Figura 50. Diseño experimental del protocolo de progresión tumoral utilizado para evaluar el efecto *in vivo* del tratamiento con CuHL1, sobre xenotrasplantes de OSA MG-63 en ratones atímicos. El grupo control recibió solución fisiológica en lugar de la droga.

5.3.3.1 Efecto del tratamiento con CuHL1 sobre la progresión tumoral

En la figura 51A se muestran las curvas de crecimiento tumoral correspondientes al control y CuHL1. Luego de 4 semanas de tratamiento, los animales tratados con CuHL1 alcanzan un volumen final de $172,1 \pm 69,9 \text{ mm}^3$, mientras que el volumen de los animales control es de $288,5 \pm 60,1 \text{ mm}^3$. CuHL1 generó una inhibición del crecimiento tumoral de un 40,3% en comparación al control. Los valores de peso tumoral resecado confirman el efecto del complejo sobre la carga tumoral final (Figura 51B). El tratamiento con CuHL1 produjo una reducción del 29% en el peso tumoral con respecto al control (control: $170,4 \pm 28,5 \text{ mg}$; CuHL1: $121,0 \pm 35,9 \text{ mg}$). Además, al analizar las tasas de crecimiento tumoral (TCT) a día 29 (Figura 51C), el tratamiento con CuHL1 logró una reducción estadísticamente significativa de la TCT, mostrando un porcentaje de inhibición del 30,2%. La figura 52 muestra imágenes representativas de los xenotrasplantes MG-63 en ratones atímicos pertenecientes a los distintos grupos experimentales. Estas fotografías fueron tomadas el día 30 del protocolo, antes de su finalización.

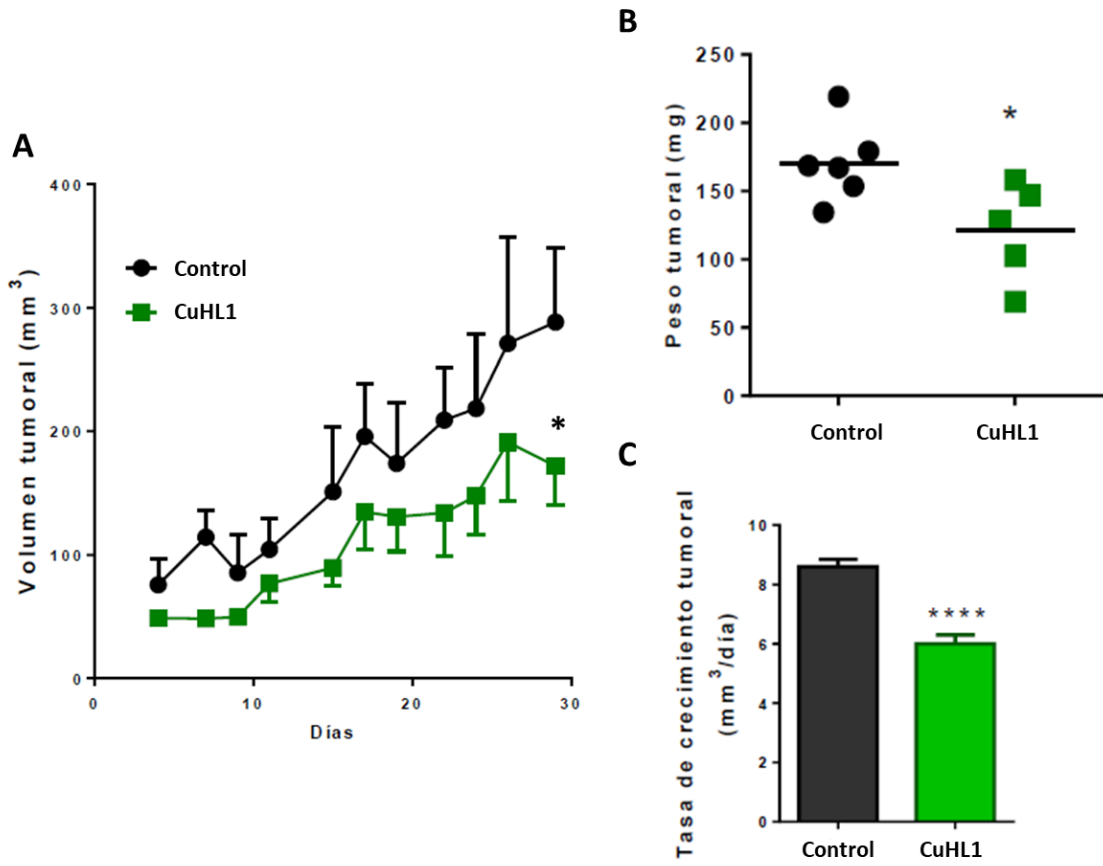


Figura 51. Progresión tumoral. (A) Curvas de crecimiento tumoral de los grupos experimentales, expresado como el volumen tumoral promedio. Se utilizaron 5 animales por grupo experimental. (B) Peso de las piezas tumorales resecadas luego de la necropsia a día 30. (C) Tasas de crecimiento tumoral de los grupos experimentales entre los días 3 y 29. Los resultados se expresan como la media \pm SEM (n=6). * Diferencia significativa con el control (p<0,05).

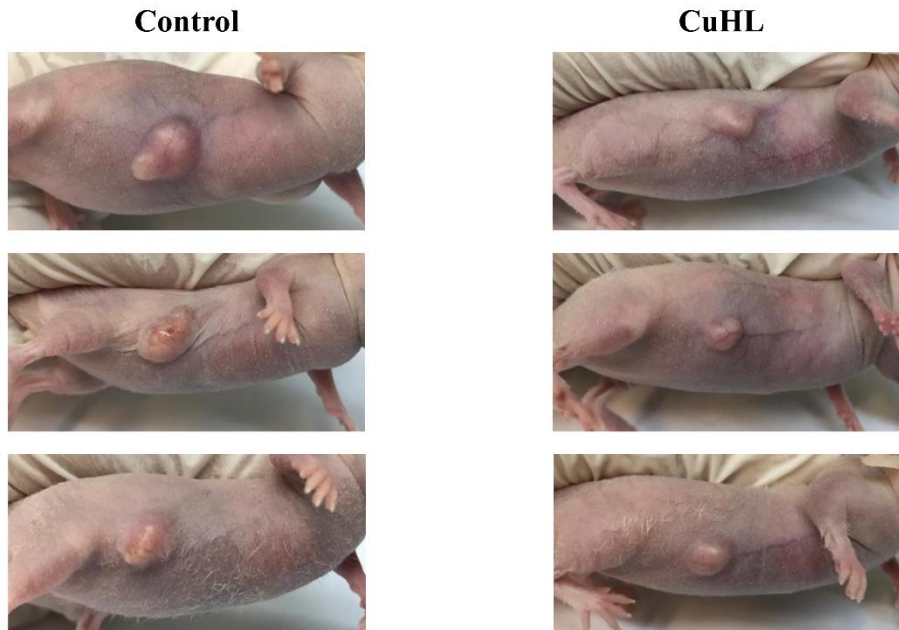


Figura 52. Imágenes representativas de xenotrasplantes MG-63 en ratones atímicos pertenecientes a los distintos grupos experimentales tomadas el día 30 de protocolo previo a la finalización.

5.3.3.2 Efecto del tratamiento con CuHL1 sobre el índice mitótico tumoral

La determinación del Índice Mitótico (IM) en preparados histológicos de muestras tumorales de OSA es utilizada para evaluar el nivel de proliferación del tejido transformado [122]. Dado que una mitosis elevada está asociada a OSA más agresivos y una prognosis significativamente peor, una vez finalizado el protocolo *in vivo* se calculó el IM en distintas secciones de los tumores pertenecientes a los distintos tratamientos. El IM fue expresado como el número de cuerpos mitóticos por HPF a una magnificación final de 400X. Se encontró que los IM del grupo control y CuHL1 fueron $4,7 \pm 2,7$ y $2,4 \pm 1,4$ respectivamente (Figura 53).

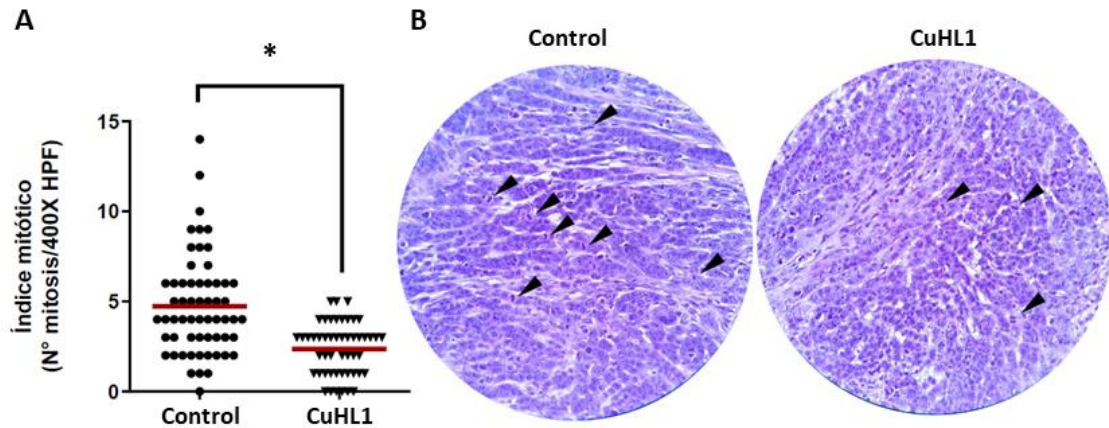


Figura 53. (A) Cuantificación del índice mitótico (IM) en muestras tumorales de los distintos grupos experimentales. El IM se expresó como el número de cuerpos mitóticos por HPF. (B) Imágenes representativas de preparados histológicos teñidos mediante H&E de las piezas tumorales de cada grupo experimental. Las flechas señalan los cuerpos mitóticos encontrados. Aumento 400X. Los resultados se expresan como la media \pm SEM. * Diferencia significativa con el control ($p < 0,05$).

5.3.3.3 Efecto del tratamiento con CuHL1 sobre la necrosis tumoral

La evaluación cuantitativa de la necrosis tumoral en OSA se ha convertido en una herramienta sumamente relevante para la evaluación de la respuesta terapéutica y del pronóstico de la enfermedad [123].

Se realizó la cuantificación de las regiones viables y no viables de los tejidos tumorales y se determinaron las tasas de necrosis tumoral ajustadas (TNA) de todos los grupos experimentales (Figura 54). El tratamiento con CuHL1 fue capaz de aumentar significativamente la TNA en comparación con el control, desde $57,1 \pm 9,6$ a $73,3 \pm 5,1\%$ respectivamente.

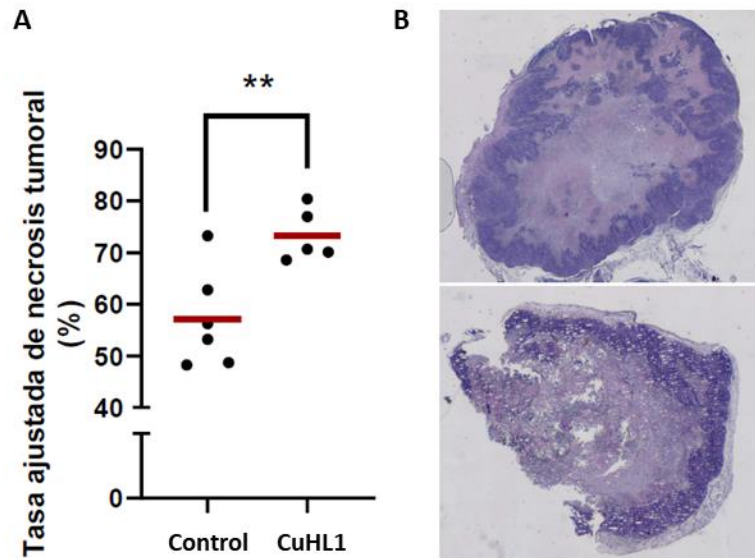


Figura 54. (A) Porcentaje de necrosis tumoral en muestras tumorales bajo los distintos tratamientos explorados. El valor fue ajustado a la variación de volumen tumoral y expresado como tasa ajustada de necrosis tumoral. (B) Imágenes representativas de las secciones tumorales completas de los distintos grupos experimentales. Los resultados se expresan como la media \pm SEM (n=6). * Diferencia significativa con el control ($p < 0,05$).

5.3.3.4 Evaluación de los efectos tóxicos

El tratamiento con CuHL1 fue bien tolerado por los animales, no detectándose cambios significativos en su peso corporal (Figura 55), así como tampoco modificaciones en el consumo de agua y alimento durante todo el protocolo.

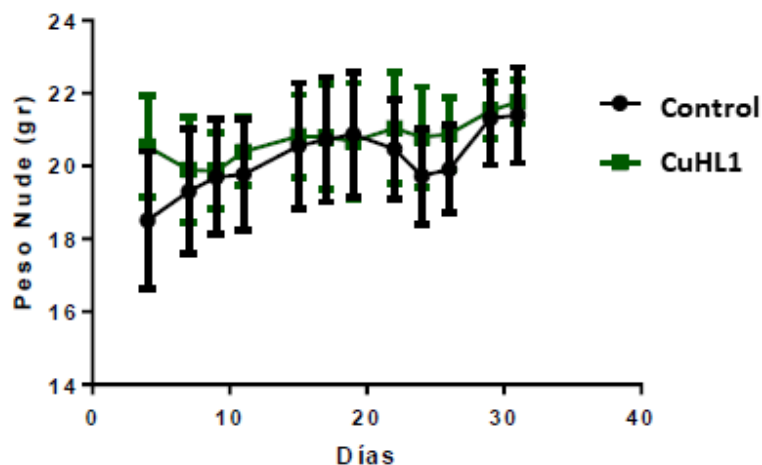


Figura 55. Peso corporal de los animales durante el protocolo.

La figura 56 muestra el análisis histopatológico de riñón, hígado y cerebro luego del tratamiento con CuHL1. No se observaron alteraciones histopatológicas o señales de toxicidad en los tejidos hepático y cerebral. Sin embargo, regiones aisladas de necrosis tubular aguda se detectaron en el tejido renal.

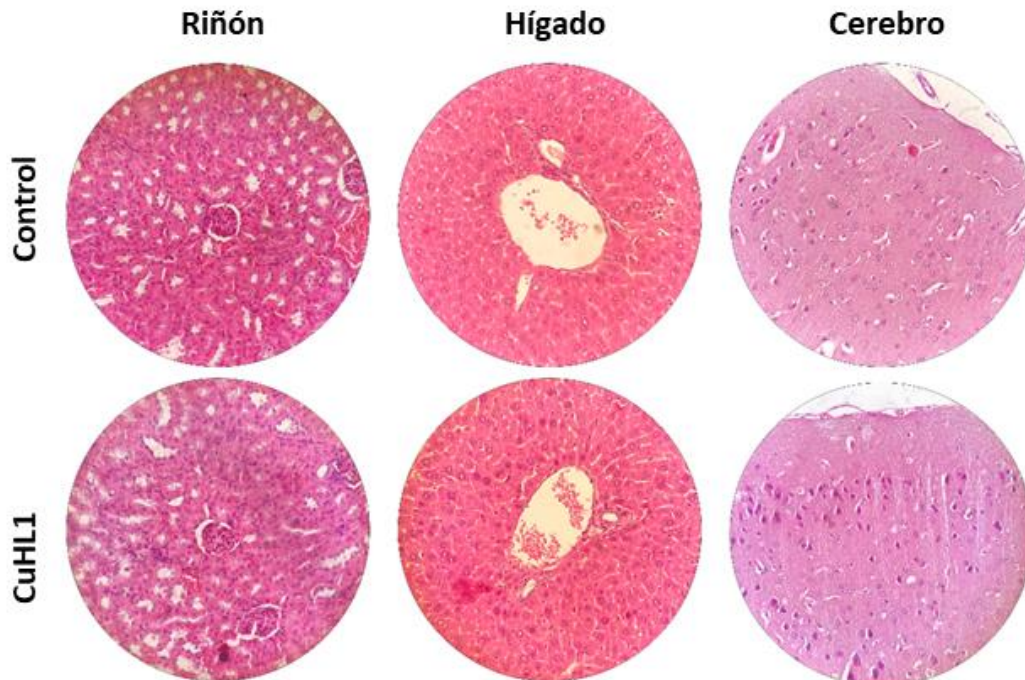


Figura 56. Microfotografías representativas de tejido renal (córtes), hepático (triada portal) y cerebral (córtes) recuperados de ratones tratados con CuHL1 o control. Aumento 400X.

Por otro lado, se analizaron parámetros bioquímicos y hematológicos luego del tratamiento. Los resultados se muestran en las tablas 9 y 10. Se encontraron aumentos no significativos en los niveles de la alanina aminotransferasa y la aspartato aminotransferasa con el tratamiento con CuHL1 en comparación al control. Por otro lado, los niveles de proteínas totales, creatinina y bilirrubina no se vieron alterados. El análisis hematológico mostró un descenso significativo del conteo de monocitos en los ratones tratados con CuHL1, vinculados a la posible actividad citotóxica de este complejo. A su vez, el tratamiento con el complejo produjo un aumento no significativo de la cantidad de basófilos.

Tabla 9. Parámetros bioquímicos y hematológicos generales de los ratones luego de los distintos tratamientos explorados.

Parámetros											
	Peso (g)	Hematocrito (%)	RBC (10 ⁶ /ml)	WBC (10 ³ /ml)	Colesterol (mg/ml)	Proteína total (g/dl)	Bilirrubina directa (mg/ml)	Creatinina (mg/ml)	AST (IU/l)	ALT (IU/l)	Albúmina plasmática (g/dl)
Control	21,40 ±1,32	38,67 ±1,86	72,58 ±4,30	2,87 ±1,04	81,17 ±13,51	4,21 ±0,40	0,02 ±0,01	0,13 ±0,04	135,7 ±16,33	40,17 ±11,48	2,52 ±0,18
CuHL1	21,76 ±0,59	39,25 ±2,22	72,00 ±4,68	1,83 ±0,64	87,00 ±18,20	3,94 ±0,69	0,01 ±0,01	0,13 ±0,06	191,8 ±62,38	68,75 ±46,02	2,64 ±0,38

RBC: glóbulos rojos. WBC: glóbulos blancos. AST: aspartato aminotransferasa. ALT: alanina aminotransferasa. IU: unidades internacionales.

Tabla 10. Fórmula leucocitaria absoluta en ratones luego de los distintos tratamientos explorados.

* Diferencia significativa con el control ($p < 0,01$)

Fórmula Leucocitaria absoluta						
	Neutrófilo en Cayado	Neutrófilos Segmentados	Eosinófilos	Basófilos	Linfocitos	Monocitos
Control	0,0±0,0	238,8±204	0,0±0,0	56,5±39,7	2410±866,3	102,4±47,3
CuHL1	0,0±0,0	61,5±63	2,25±6,5	131±88,3	1567±583,9	17,3±7,5*

6 CONCLUSIONES

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 y de larga duración. 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.

En este sentido, el objetivo de este trabajo fue estudiar las propiedades antitumorales de dos complejos de cobre(II) con ligandos derivados de hidrazonas, y dilucidar su mecanismo de acción en líneas humanas de cáncer de mama y de cáncer de hueso. Para llevar a cabo este objetivo, se utilizaron dos sistemas de cultivo *in vitro*, el sistema monocapa (2D) y el de esferoides multicelulares (3D), y un modelo *in vivo*.

En un primer lugar, se analizó la actividad antitumoral de una serie de complejos de Cu(II) con ligandos derivados de hidrazonas. Se puede inferir que la actividad citotóxica de los complejos de cobre está influenciada por la geometría y/o la carga de los mismos, siendo más activos los complejos de estequiometría 1:1 L:M. En particular, los complejos CuHL1 y CuHL2 fueron los más citotóxicos en las líneas de cáncer de mama y OSA.

Por otro lado, la hipótesis planteada en este trabajo de tesis Doctoral propone que la complejación de un metal con un ligando puede aumentar la actividad de los compuestos o bien adquirir nuevos mecanismos de acción. Esto fue demostrado ya que los dos complejos presentaron mayor citotoxicidad que los respectivos ligandos o Cu libre.

Se decidió continuar con los estudios de la actividad anticancerígena de los complejos CuHL1 y CuHL2 en cáncer de mama y OSA, debido a los resultados de citotoxicidad, así como la vacancia farmacológica presente para este tipo de tumores por diversos problemas con los tratamientos actuales.

6.1 CÁNCER DE MAMA

A partir de los resultados observados podemos concluir que CuHL1 y CuHL2 tienen efectos citotóxicos sobre las líneas tumorales de cáncer de mama. Se estudiaron los posibles mecanismos de acción más reportados para complejos de cobre, como la interacción con ADN, la producción de ERO, y la inhibición de la actividad proteasomal. Se encontró que ambos complejos son capaces de interactuar con la molécula de ADN, demostrado por su interacción con el CT-DNA, y la ruptura de la hebra de ADN, evidenciado por el ensayo cometa. Además, se demostró su capacidad de generar ERO e inhibir la actividad proteasomal. Todo esto lleva finalmente a una inducción de la apoptosis celular.

Para descubrir los posibles blancos y rutas moleculares alteradas por los compuestos se realizó un estudio de proteómica comparando la expresión de proteínas entre las células tratadas y no tratadas. Los análisis funcionales y bioinformáticos de los resultados demostraron modos de acción similares para ambos complejos, lo cual era esperado debido a los resultados similares obtenidos previamente *in vitro*. El tratamiento con CuHL1 y CuHL2 generó un incremento de proteínas involucradas en el estrés de RE y la UPR. Estos resultados podrían estar relacionados a la generación de ERO y la inhibición de la actividad proteasomal, los cuales son procesos que pueden generar estrés en RE. Así mismo, se encontró una disminución de proteínas relacionadas en la replicación y reparación del ADN, la cual puede deberse a la capacidad de ambos compuestos de interactuar y generar daño en el ADN. Además, se encontró un efecto novedoso y nunca antes descrito para metalofármacos de cobre, que se relaciona con la disminución de la expresión de proteínas relacionadas con el metabolismo y la síntesis de lípidos. Las células cancerígenas tienen un mayor requerimiento de lípidos, ya sea para la síntesis de nuevas membranas biológicas, o como fuente de energía. Es por esto que una disminución en los niveles lipídicos puede resultar beneficioso en el tratamiento antitumoral.

Por otro lado, ambos complejos demostraron tener una gran actividad citotóxica en los modelos de cáncer de mama 3D. En esferoides multicelulares se obtuvieron valores de IC₅₀ cercanos a los obtenidos en monocapa. Esto demuestra la potencia de estos complejos, ya que en general se observa una disminución en el efecto antitumoral

cuando se pasa de un modelo 2D a una 3D debido a la resistencia multicelular. Además, los dos complejos ejercen un efecto inhibitorio en la formación de mamoesferas, y una disminución en la población de CMC.

Estos datos sugieren que los complejos CuHL1 y CuHL2, son potenciales candidatos para futuras investigaciones en ensayos *in vivo* para estudiar su eficacia y actividad en ese tipo de modelos y determinar finalmente su potencial actividad terapéutica en tumores mamarios.

6.2 CÁNCER DE HUESO

En la línea celular de OSA (MG-63), ambos complejos presentaron actividad antitumoral, siendo capaces de inhibir la viabilidad y la proliferación celular en un rango de concentraciones sub-micromolares.

También se estudiaron los mecanismos de acción más comunes para los complejos de cobre. Se encontró que, al igual que en las líneas de cáncer de mama, CuHL1 y CuHL2 fueron capaces de generar daño en el ADN, inhibir la actividad proteasomal e inducir la muerte celular programada.

Se realizó un estudio de proteómica para descubrir los posibles blancos y rutas moleculares alteradas por los compuestos. Los análisis funcionales y bioinformáticos de los resultados demostraron que ambos complejos, al igual que en la línea de cáncer de mama, generan una sobre-expresión de proteínas relacionadas el estrés de RE y la UPR. Estos procesos pueden deberse a la generación de ERO y la inhibición de la actividad proteasomal. Además, se observa un incremento en proteínas relacionadas con la síntesis de ATP, al igual que una disminución de proteínas mitocondriales, lo cual podría indicar una alteración de las actividades mitocondriales.

También se utilizó el modelo de esferoides multicelulares de la línea MG-63. Ambos complejos demostraron tener una gran actividad citotóxica en el modelo 3D de OSA, afectando también la forma y volumen de los esferoides. En esta línea, los valores de IC₅₀ obtenidos para el modelo 3D fueron 4 veces más grandes que los encontrados en monocapa. Esta diferencia se debe a la resistencia multicelular generada por las

variaciones en el microambiente dentro del esferoide, como el pH, hipoxia, la matriz extracelular, y a la diferencia en la penetración de la droga.

Finalmente, se estudió el efecto de CuHL1 *in vivo* en ratones atímicos N:NIH(S) Fox1^{nu/un} xenotransplantados con MG-63. El tratamiento durante 4 semanas con CuHL1 (2 mg/kg i.p. tres veces por semana) afectó notablemente la progresión tumoral, aumentando la necrosis y reduciendo la tasa de crecimiento tumoral y el índice mitótico, los cuales son resultados alentadores para el tratamiento antitumoral. Es importante destacar que no se observaron alteraciones histopatológicas ni signos importantes de toxicidad en el tejido hepático o cerebral y se observaron aumentos no significativos en los niveles de alanina aminotransferasa y aspartato aminotransferasa en los animales tratados con CuHL1. Además, los niveles de proteína total, creatinina y bilirrubina permanecieron inalterados. Sin embargo, se observó una caída significativa en el recuento de monocitos en los ratones tratados con el complejo de cobre.

Todas estas evidencias sugieren que los complejos de cobre(II) demuestran una prometedora actividad anticancerígena contra OSA.

Estos datos alentadores sugieren que el complejo CuHL1 es un potencial candidato para ser estudiado *in vivo* en un modelo singeneico de OSA, donde se puedan abordar aspectos inmunológicos de la ya probada actividad antitumoral del mismo.

7 ANEXO

7.1 COMPLEJOS DE COBRE

7.1.1 Viabilidad celular

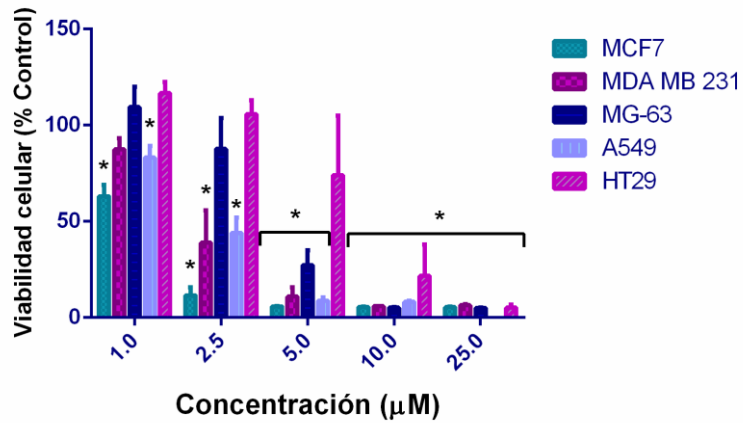


Figura 55. Gráfica de viabilidad celular vs concentración del complejo CuHL1. Método MTT. Los resultados se expresan como la media \pm SEM (n=12). *Diferencia significativa con el control (p<0.05).

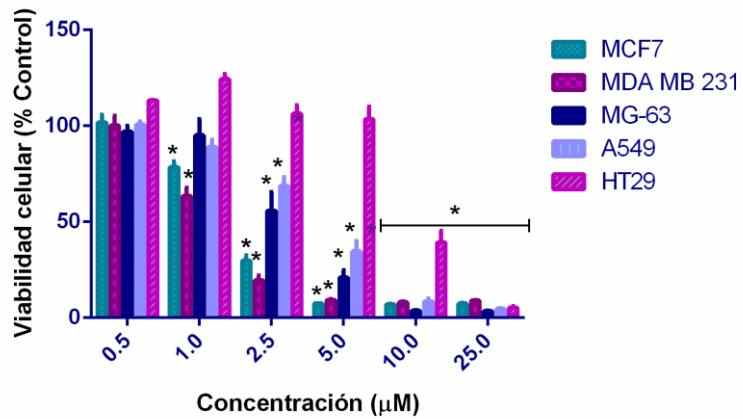


Figura 56. Gráfica de viabilidad celular vs concentración del complejo CuHL2. Método MTT. Los resultados se expresan como la media \pm SEM (n=12). *Diferencia significativa con el control (p<0.05).

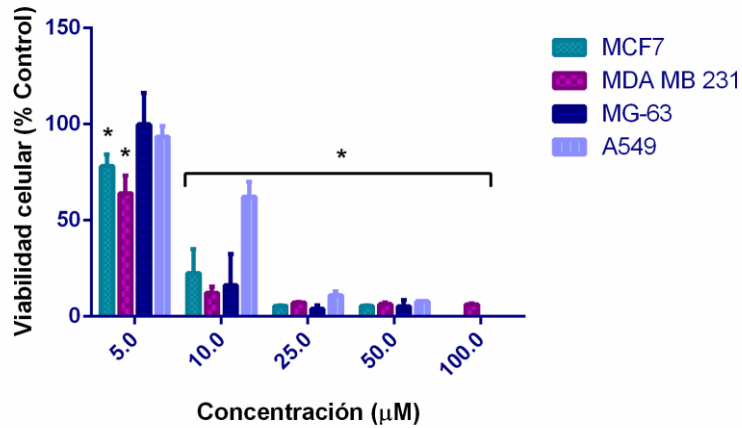


Figura 57. Gráfica de viabilidad celular vs concentración del complejo CuHL3. Método MTT. Los resultados se expresan como la media \pm SEM (n=12). *Diferencia significativa con el control ($p < 0.05$).

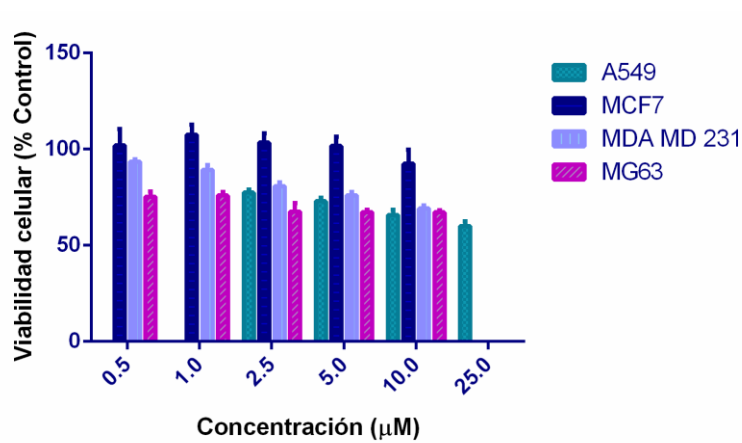


Figura 58. Gráfica de viabilidad celular vs concentración del complejo CuL4. Método MTT. Los resultados se expresan como la media \pm SEM (n=12). *Diferencia significativa con el control ($p < 0.05$).

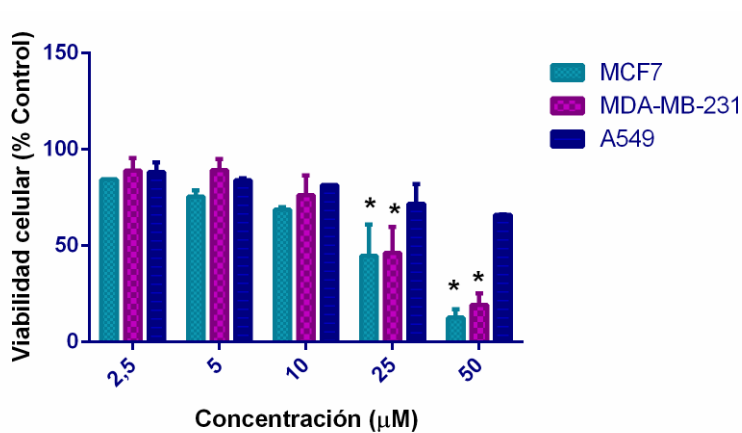


Figura 59. Gráfica de viabilidad celular vs concentración del complejo CuL5. Método MTT. Los resultados se expresan como la media \pm SEM (n=12). *Diferencia significativa con el control ($p < 0.05$).

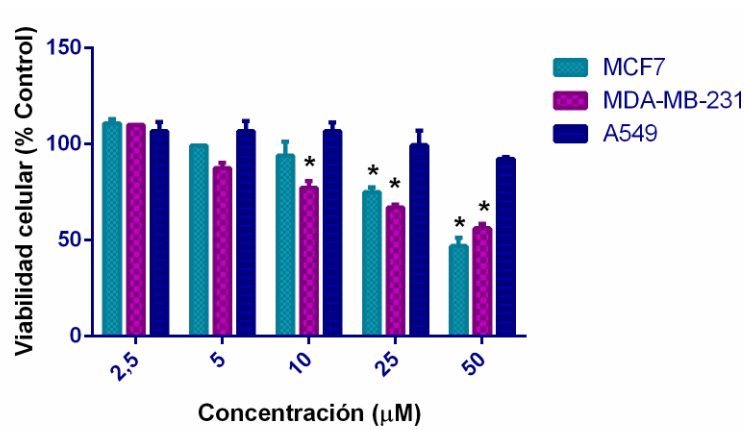


Figura 60. Gráfica de viabilidad celular vs concentración del complejo ZnL5. Método MTT. Los resultados se expresan como la media \pm SEM (n=12). *Diferencia significativa con el control (p<0.05).

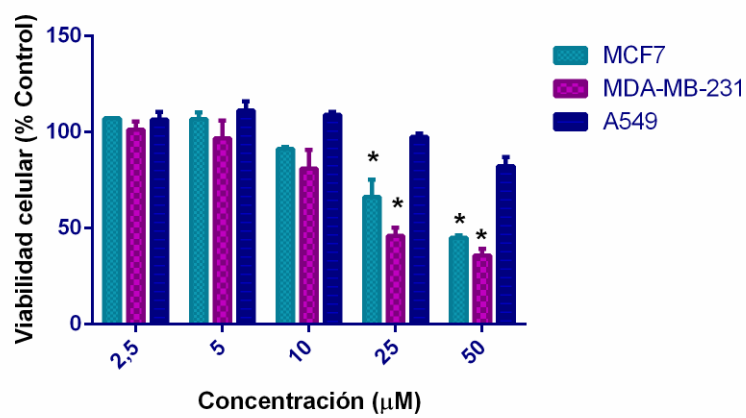


Figura 61. Gráfica de viabilidad celular vs concentración del complejo VOL5. Método MTT. Los resultados se expresan como la media \pm SEM (n=12). *Diferencia significativa con el control (p<0.05).

7.2 CÁNCER DE MAMA

7.2.1 Viabilidad celular

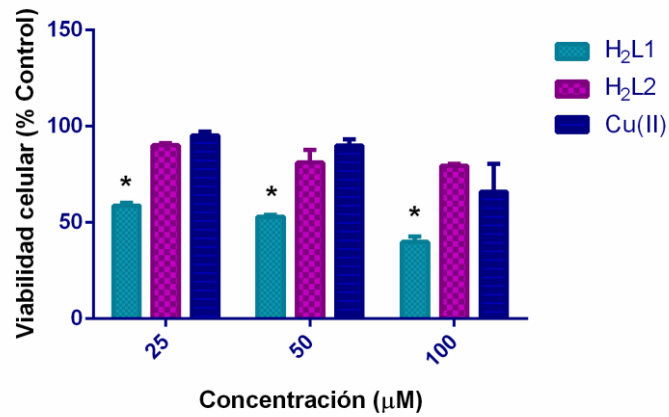


Figura 62. Gráficas de viabilidad celular vs concentración de H₂L1, H₂L2 y Cu(II) en la línea MCF7. Método MTT. Los resultados se expresan como la media \pm SEM (n=12). *Diferencia significativa con el control ($p < 0.05$).

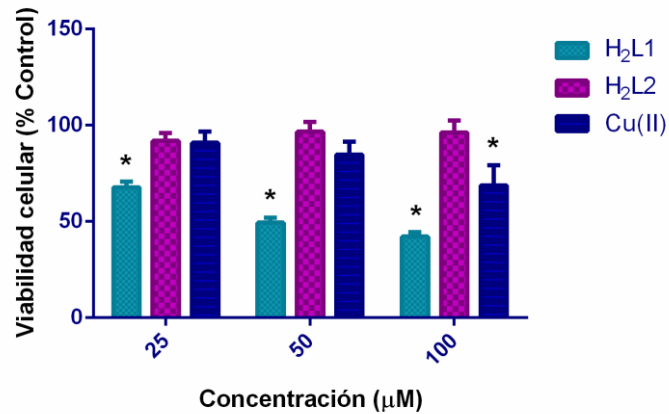


Figura 63. Gráficas de viabilidad celular vs concentración de H₂L1, H₂L2 y Cu(II) en la línea MDA-MB-231. Método MTT. Los resultados se expresan como la media \pm SEM (n=12). *Diferencia significativa con el control ($p < 0.05$).

7.2.2 Inducción de Apoptosis

7.2.2.1 CuHL1

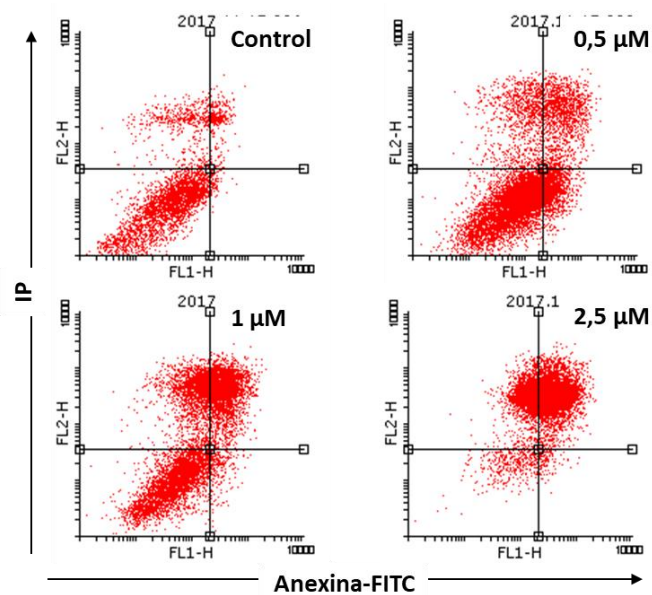


Figura 64. Dot plots de los resultados de apoptosis de la línea celular MCF7 obtenidos luego del tratamiento con CuHL1.

Tabla 11. Tabla de los resultados de apoptosis de la línea celular MCF7 obtenidos luego del tratamiento con CuHL1.

	Vivas	An+	IP+	An+/IP+
Control	87,86 ± 0,26	0,81 ± 0,01	9,27 ± 0,43	2,05 ± 0,15
0,5	70,28 ± 3,91	6,29 ± 3,71	11,89 ± 1,39	11,55 ± 1,48
1	38,13 ± 1,31	1,72 ± 0,54	34,82 ± 8,02	25,32 ± 6,98
2,5	3,65 ± 0,18	1,12 ± 0,19	39,46 ± 9,29	55,76 ± 9,23

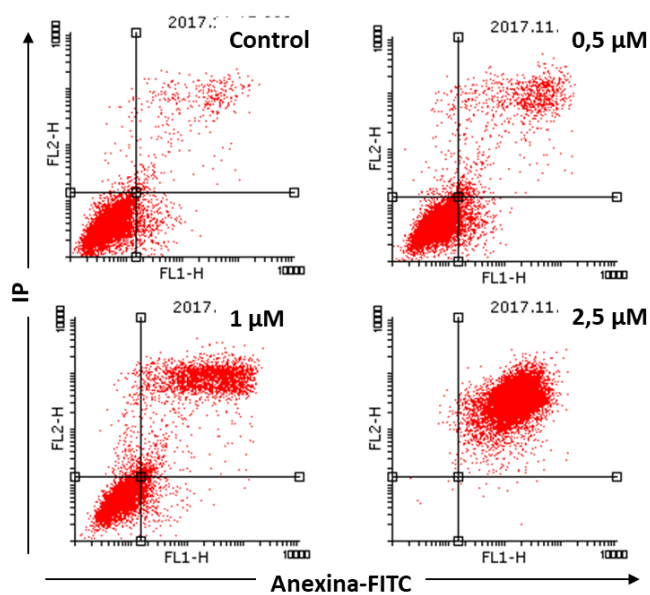


Figura 65. Dot plots de los resultados de apoptosis de la línea celular MDA-MB-231 obtenidos luego del tratamiento con CuHL1.

Tabla 12. Tabla de los resultados de apoptosis de la línea celular MDA-MB-231 obtenidos luego del tratamiento con CuHL1.

	Vivas	An+	IP+	An+/IP+
Control	90,90 ± 0,12	3,62 ± 0,46	1,33 ± 0,32	4,15 ± 0,11
0,5	83,72 ± 0,87	4,80 ± 0,67	2,30 ± 0,43	9,18 ± 0,67
1	58,83 ± 3,07	4,56 ± 0,88	4,45 ± 0,67	32,17 ± 1,71
2,5	0,04 ± 0,01	0,08 ± 0,01	0,29 ± 0,06	99,59 ± 0,07

7.2.2.2 CuHL2

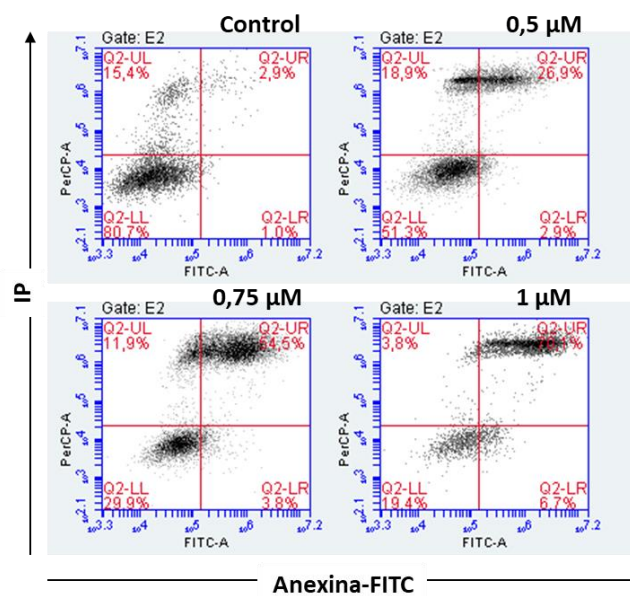


Figura 66. Dot plots de los resultados de apoptosis de la línea celular MCF7 obtenidos luego del tratamiento con CuHL2.

Tabla 13. Tabla de los resultados de apoptosis de la línea celular MCF7 obtenidos luego del tratamiento con CuHL2.

	Vivas	An+	IP+	An+/IP+
Control	80,7 ± 0,9	1,9 ± 0,6	12,6 ± 2,0	4,9 ± 2,1
0,25 μM	77,6 ± 2,6	5,0 ± 2,1	9,1 ± 0,6	8,2 ± 1,7
0,5 μM	55,0 ± 6,5	3,1 ± 1,0	13,8 ± 2,5	28,0 ± 5,5
0,75 μM	27,8 ± 2,3	2,3 ± 0,8	19,2 ± 3,7	50,8 ± 2,5
1 μM	20,7 ± 5,8	4,7 ± 1,1	4,3 ± 0,9	70,4 ± 6,9

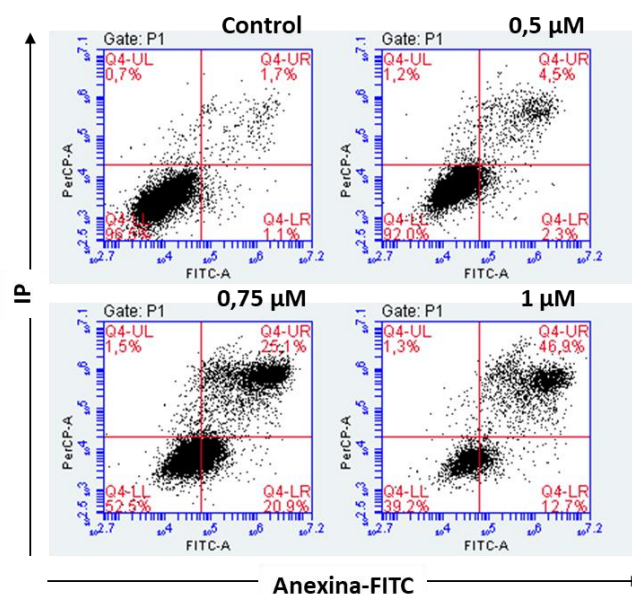


Figura 67. Dot plots de los resultados de apoptosis de la línea celular MDA-MB-231 obtenidos luego del tratamiento con CuHL2.

Tabla 14. Tabla de los resultados de apoptosis de la línea celular MDA-MB-231 obtenidos luego del tratamiento con CuHL2.

	Vivas	An+	IP+	An+/IP+
Control	95,9 ± 0,5	1,4 ± 0,2	0,6 ± 0,1	2,1 ± 0,3
0,25 μM	94,1 ± 0,6	1,5 ± 0,1	1,3 ± 0,5	3,1 ± 0,1
0,5 μM	91,4 ± 0,4	2,4 ± 0,2	1,3 ± 0,2	4,9 ± 0,2
0,75 μM	53,4 ± 4,7	19,1 ± 1,5	1,6 ± 0,1	25,9 ± 3,4
1 μM	42,0 ± 1,5	14,0 ± 0,7	1,7 ± 0,2	42,4 ± 2,4

7.2.3 Estudio de posibles blancos moleculares

7.2.3.1 Proteínas sobre-reguladas

Tabla 14. Análisis de enriquecimiento GO de las proteínas sobre-expresadas luego del tratamiento con CuHL1. Los porcentajes de representación de cada categoría fueron determinados como el porcentaje sobre el total de las proteínas diferencialmente expresadas.

Procesos biológicos	Porcentajes	Proteínas
---------------------	-------------	-----------

Respuesta a proteínas no plegadas	21,4	DNAJB1, THBS1, HSPH1, BAG3, HSPA1B, DNAJA1
Biogénesis ribosomal	21,4	ZNF622, DDX21, RPL12, RPL7A, RPS8, RPL10
Regulación negativa de señalización apoptótica	17,9	THBS1, GCLM, SLC25A5, HSPA1B, DNAJA1
Plegamiento de proteínas mediado por chaperonas	14,3	DNAJB1, HSPH1, CHORDC1, HSPA1B
Respuesta al calor	14,3	THBS1, BAG3, HSPA1B, DNAJA1
Replegamiento de proteínas dependiente de cofactores de chaperonas	10,7	DNAJB1, HSPH1, HSPA1B

Funciones moleculares	Porcentajes	Proteínas
Unión a ARN	46,4	FUS, ZNF622, CSTF3, RPL21, DDX21, RPL12, SLC25A5, RPL7A, HSPA1B, KTN1, RPS8, TOP2A, RPL10
Constituyentes estructurales de ribosomas	17,9	RPL21, RPL12, RPL7A, RPS8, RPL10
Unión a proteínas heat shock	14,3	DNAJB1, CHORDC1, HSPA1B, DNAJA1
Unión al dominio RING finger de tipo C3HC4	7,1	HSPA1B, DNAJA1
Actividad de factor de intercambio de adenil-nucleótido	7,1	HSPH1, BAG3

Componentes celulares	Porcentajes	Proteínas
Citosol	60,7	DNAJB1, ACTC1, ZNF622, HSPH1, RPL21, DDX21, ARHGEF18, RPL12, BAG3, GCLM, RPL7A, HSPA1B, DNAJA1, SRXN1, RPS8, RPL10, MAP1LC3B2
Exosoma extracelular	39,3	SLC25A3, DNAJB1, ARF3, THBS1, ACTC1, HSPH1, ARHGEF18, RPL12, HSPA1B, DNAJA1, RPS8
Ribosoma citosólico	17,9	RPL21, RPL12, RPL7A, RPS8, RPL10
Adhesión focal	17,9	ACTC1, RPL12, RPL7A, HSPA1B, RPS8

Tabla 15. Análisis de enriquecimiento GO de las proteínas sobre-expresadas luego del tratamiento con CuHL2. Los porcentajes de representación de cada categoría fueron determinados como el porcentaje sobre el total de las proteínas diferencialmente expresadas.

Procesos biológicos	Porcentajes	Proteínas
Respuesta a proteínas no plegadas	30,4	DNAJB1, THBS1, HSPA6, HSPH1, BAG3, HSPA1B, DNAJA1
Regulación negativa de señalización apoptótica	21,7	THBS1, GCLM, SLC25A5, HSPA1B, DNAJA1

Respuesta al calor	21,7	THBS1, HSPA6, BAG3, HSPA1B, DNAJA1
Replegamiento de prot dependiente de cofactores de chaperonas	17,4	DNAJB1, HSPA6, HSPH1, HSPA1B
Respuesta celular al calor	17,4	THBS1, HSPA6, BAG3, HSPA1B
Regulación negativa del establecimiento de proteínas en mitocondria	8,7	BAG3, DNAJA1

Funciones moleculares	Porcentajes	Proteínas
Unión a proteínas heat shock	26,1	AHSA1, DNAJB1, HSPA6, CHORDC1, HSPA1B, DNAJA1
Actividad regulatoria de ATPasa	21,7	AHSA1, DNAJB1, HSPH1, BAG3, DNAJA1
Unión a chaperonas	17,4	AHSA1, DNAJB1, BAG3, DNAJA1
Unión a proteínas no plagadas	17,4	DNAJB1, HSPA6, HSPA1B, DNAJA1
Actividad de activación de ATPasa	13,0	AHSA1, DNAJB1, DNAJA1
Chaperona de plegamiento de proteínas	13,0	DNAJB1, HSPA6, HSPA1B
Unión al dominio de RING finger tipo C3HC4	8,7	HSPA1B, DNAJA1
Actividad de factor de intercambio de adenil-nucleótido	8,7	HSPH1, BAG3

7.2.3.2 Proteínas sub-reguladas

Tabla 16. Análisis de enriquecimiento GO de las proteínas sub-expresadas luego del tratamiento con CuHL1. Los porcentajes de representación de cada categoría fueron determinados como el porcentaje sobre el total de las proteínas diferencialmente expresadas.

Procesos biológicos	Porcentajes	Proteínas
Procesos metabólicos de sustancias orgánicas	73,2	CYP51A1, MCM5, PCK2, IRF2BPL, ACOT2, ALDH2, DNAJA3, MAP2K2, PRPSAP2, TP53, FADS2, DLAT, IGFBP7, IDH3A, ACO1, SMCHD1, RRM2, ADSS, PSMD4, DPYD, SDC4, ENG, SNX5, PC, FAF1, TST, POLD1, ALG2, LDLR, POLDIP2
Procesos metabólicos de pequeñas moléculas	36,6	CYP51A1, PCK2, ACOT2, ALDH2, PRPSAP2, FADS2, DLAT, IDH3A, ACO1, RRM2, ADSS, DPYD, PC, TST, LDLR
Procesos de oxidación-reducción	24,4	CYP51A1, PXDN, ALDH2, FADS2, DLAT, IDH3A, ACO1, RRM2, DPYD, TMX1

Procesos metabólicos del ácido carboxílico	24,4	PCK2, ACOT2, FADS2, DLAT, IDH3A, ACO1, ADSS, DPYD, PC, TST
---	------	--

Componentes celulares	Porcentajes	Proteínas
Organela delimitada por membrana	90,2	CYP51A1, MCM5, PCK2, IRF2BPL, ACOT2, CORO7, PXDN, ALDH2, DNAJA3, SLC9A3R1, MAP2K2, TP53, FADS2, DLAT, OGFR, IGFBP7, IDH3A, KRT73, ACO1, SMCHD1, NDRG3, ADSS, PSMD4, NFKB2, SDC4, ENG, MAGED2, SNX5, GIPC1, PC, FAF1, TST, TMX1, POLD1, ALG2, LDLR, POLDIP2
Citoplasma	87,8	CYP51A1, MCM5, PCK2, ACOT2, CORO7, PXDN, ALDH2, DNAJA3, SLC9A3R1, MAP2K2, PRPSAP2, TP53, DLAT, OGFR, IGFBP7, HEATR2, IDH3A, KRT73, ACO1, NDRG3, RRM2, ADSS, PSMD4, NFKB2, DPYD, SDC4, MAGED2, SNX5, GIPC1, PC, FAF1, TST, POLD1, ALG2, LDLR, POLDIP2
Matriz mitocondrial	24,4	PCK2, ACOT2, ALDH2, DNAJA3, TP53, DLAT, IDH3A, PC, TST, POLDIP2

Tabla 17. Análisis de enriquecimiento GO de las proteínas sub-expresadas luego del tratamiento con CuHL2. Los porcentajes de representación de cada categoría fueron determinados como el porcentaje sobre el total de las proteínas diferencialmente expresadas.

Procesos biológicos	Porcentajes	Proteínas
Procesos biosintéticos de sustancias orgánicas	42,5	CYP51A1, MCM5, PCK2, TRIM28, DNAJA3, MCM2, TP53, FADS2, FASN, KDELC2, YARS2, ACSL4, RRM2, DPYD, SDC4, GFM1, MCM3
Ensamblado del complejo pre-replicativo	7,5	MCM5, MCM2, MCM3
Reparación de ruptura de doble hebra a través de la replicación	7,5	MCM5, MCM2, MCM3

Funciones moleculares	Porcentajes	Proteínas
Unión a nucleótidos	40	MCM5, PCK2, DNAJA3, MCM2, TP53, SCYL1, SMC2, FASN, YARS2, SMCHD1, ACSL4, DPYD, PTK7, GFM1, MYO18A, MCM3

Unión a trifosfato de ribonucleósido de purina	35	MCM5, PCK2, DNAJA3, MCM2, TP53, SCYL1, SMC2, YARS2, SMCHD1, ACSL4, PTK7, GFM1, MYO18A, MCM3
Unión a ATP	30	MCM5, DNAJA3, MCM2, TP53, SCYL1, SMC2, YARS2, SMCHD1, ACSL4, PTK7, MYO18A, MCM3
Unión al ADN simple hebra	10	MCM5, MCM2, SMC2, MCM3
Unión al origen de replicación del ADN	7,5	MCM5, MCM2, MCM3

Componentes celulares	Porcentajes	Proteínas
Región telomérica cromosómica	12,5	MCM5, MCM2, MCM3, MCM7, SMCHD1
Complejo CMG	10	MCM5, MCM2, MCM3, MCM7
Complejo MCM	7,5	MCM5, MCM2, MCM3

7.2.4 Células madre cancerígenas

7.2.4.1 CuHL1

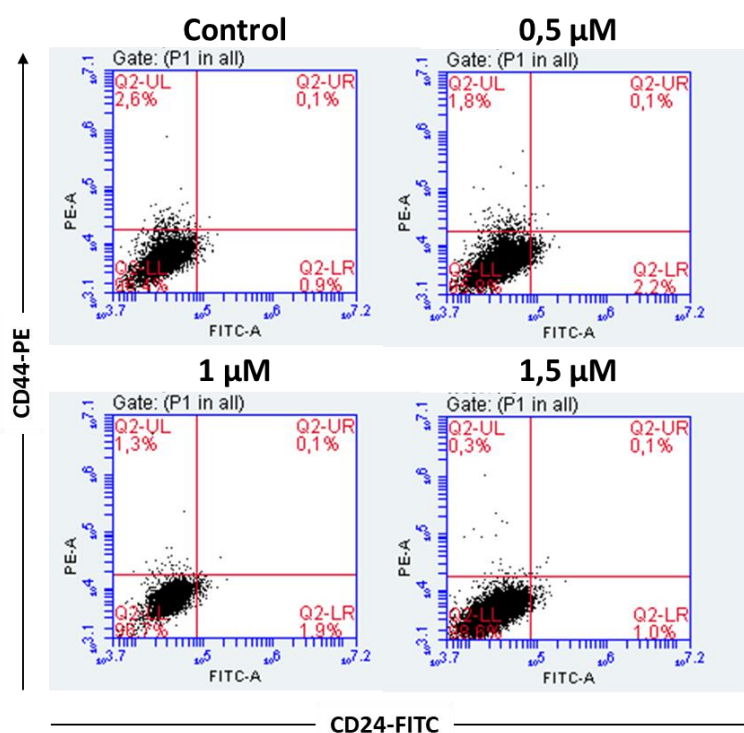


Figura 68. Dot plots de la evaluación de CMCs en la línea MCF7 luego del tratamiento con CuHL1.

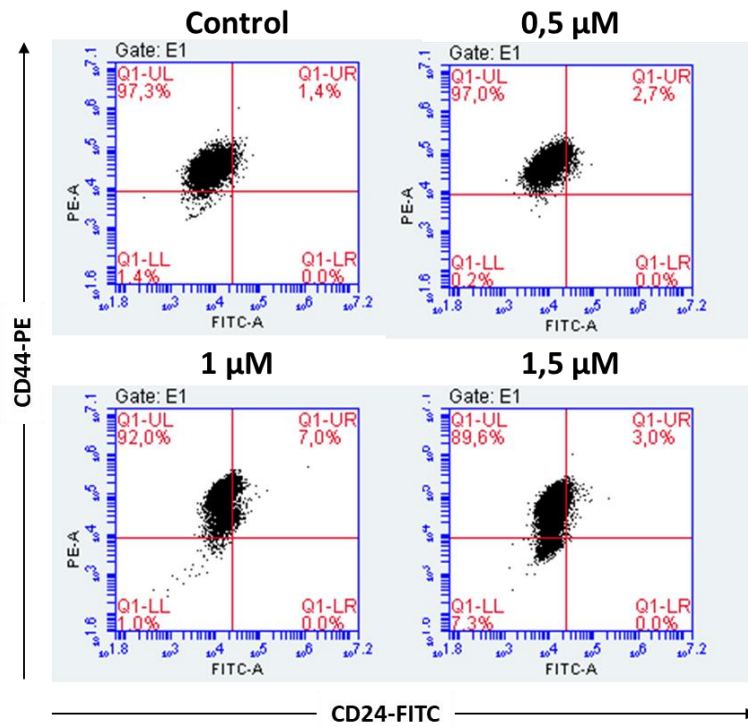


Figura 69. Dot plots de la evaluación de CMCs en la línea MDA-MB-231 luego del tratamiento con CuHL1.

7.2.4.2 CuHL2

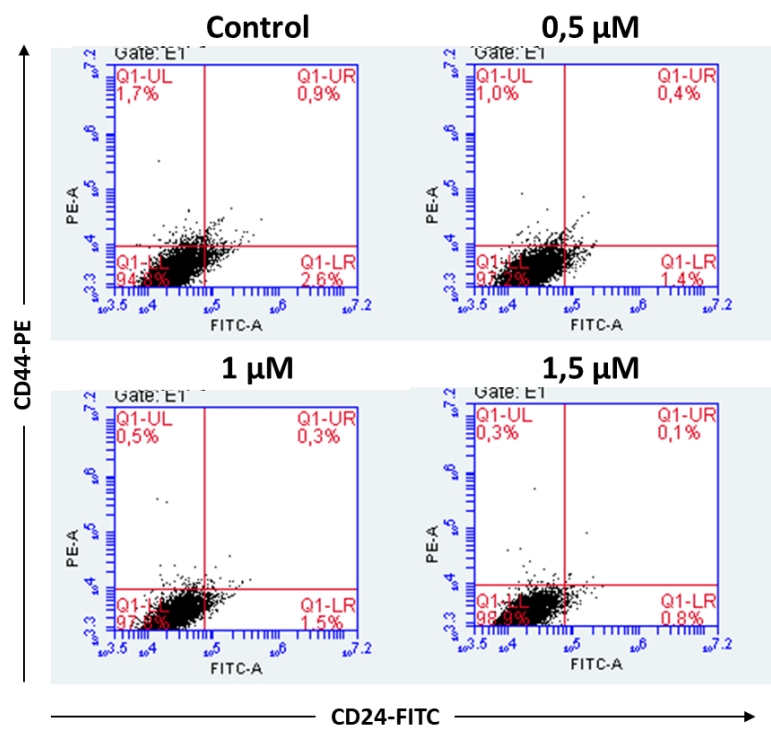


Figura 70. Dot plots de la evaluación de CMCs en la línea MCF7 luego del tratamiento con CuHL2.

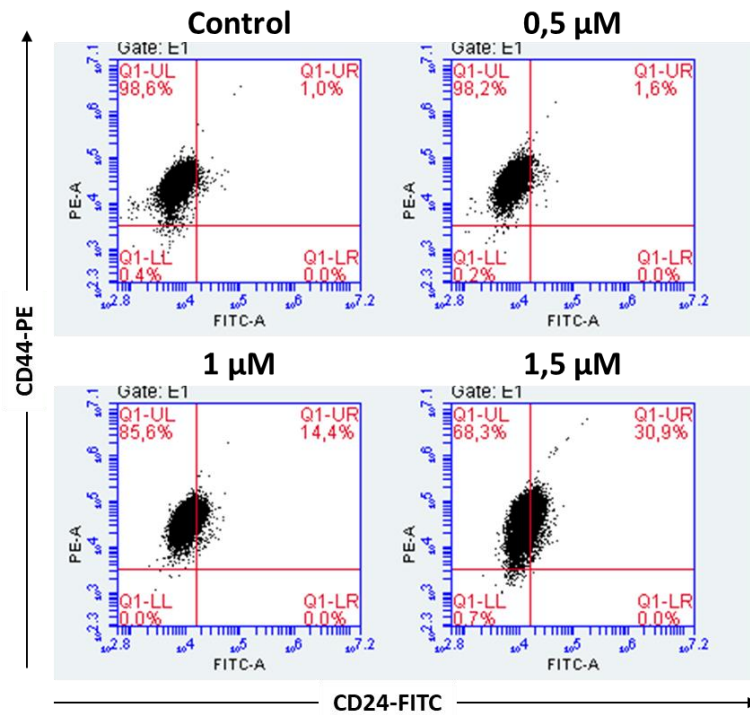


Figura 71. Dot plots de la evaluación de CMCs en la línea MDA-MB-231 luego del tratamiento con CuHL2.

7.3 CÁNCER DE HUESO

7.3.1 Viabilidad celular

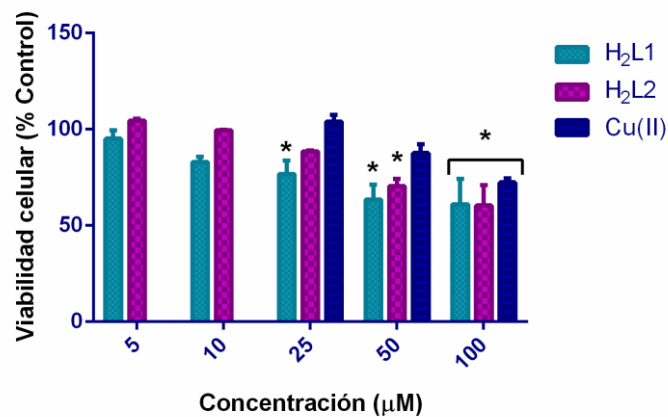


Figura 72. Gráficas de viabilidad celular vs concentración de H₂L1, H₂L2 y Cu(II) en la línea MG-63. Método MTT. Los resultados se expresan como la media ±SEM (n=12). *Diferencia significativa con el control (p<0.05).

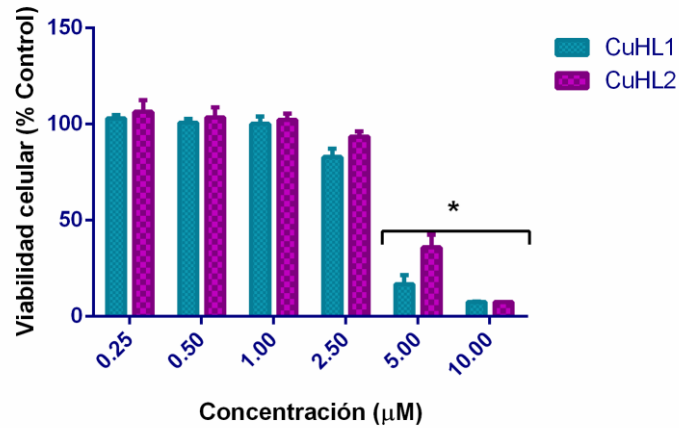


Figura 73. Gráficas de viabilidad celular vs concentración de CuHL1 y CuHL2 en la línea L929. Método MTT. Los resultados se expresan como la media \pm SEM (n=12). *Diferencia significativa con el control (p<0.05).

7.3.2 Inducción de Apoptosis

7.3.2.1 CuHL1

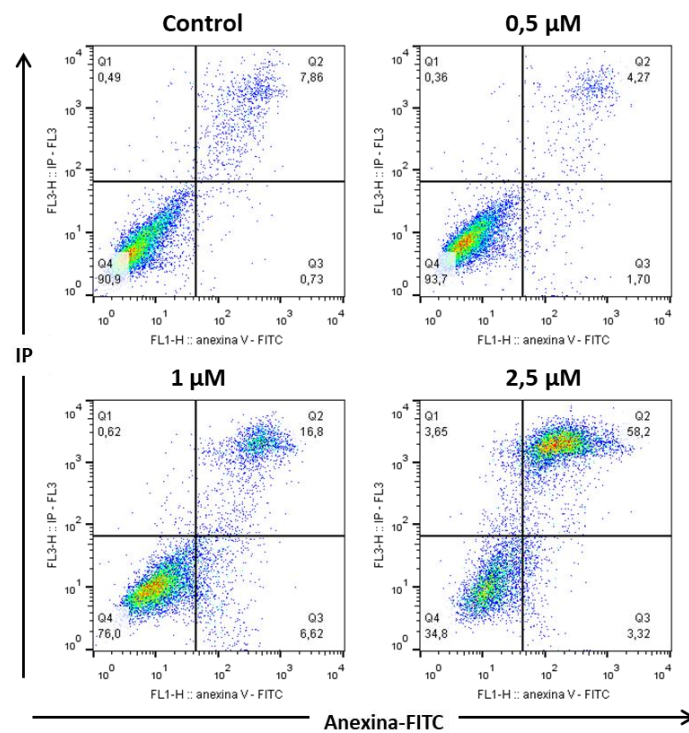


Figura 74. Dot plots de los resultados de apoptosis de la línea celular MG-63 obtenidos luego del tratamiento con CuHL1.

Tabla 18. Tabla de los resultados de apoptosis de la línea celular MG-63 obtenidos luego del tratamiento con CuHL1.

	Vivas	An+	An+/IP+	IP+
Control	92,8 ± 1,9	1,1 ± 0,4	5,3 ± 2,6	0,8 ± 0,3
0,5 µM	94,1 ± 0,4	1,6 ± 0,1	4,0 ± 0,3	0,3 ± 0,1
1 µM	77,2 ± 1,3	5,6 ± 1,0	16,5 ± 0,4	0,7 ± 0,1
2,5 µM	34,7 ± 0,2	2,9 ± 0,5	58,2 ± 0,1	4,3 ± 0,7

7.3.2.2 CuHL2

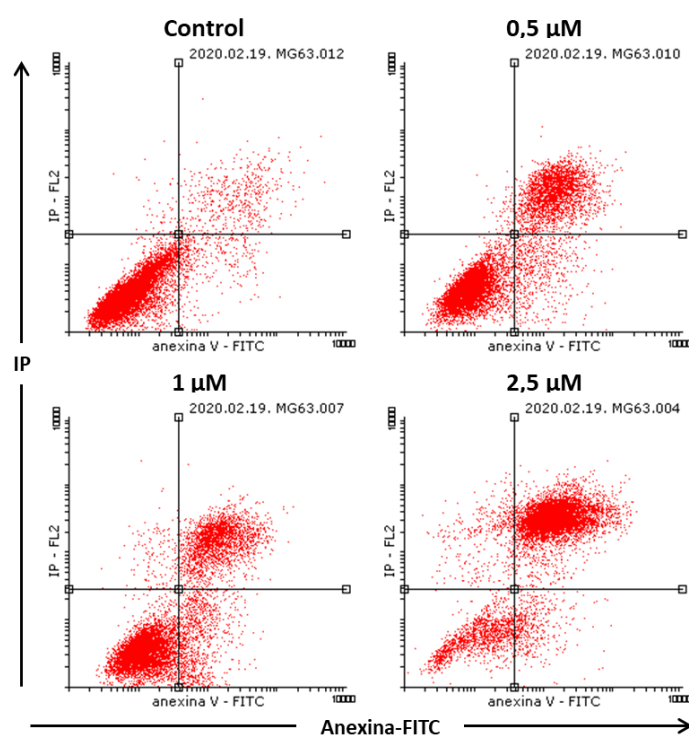


Figura 75. Dot plots de los resultados de apoptosis de la línea celular MG-63 obtenidos luego del tratamiento con CuHL2.

Tabla 19. Tabla de los resultados de apoptosis de la línea celular MG-63 obtenidos luego del tratamiento con CuHL2.

	Vivas	An+	An+/IP+	IP+
Control	89,2 ± 0,8	3,6 ± 0,6	6,5 ± 0,7	0,8 ± 0,2
0,5 µM	67,2 ± 1,7	5,5 ± 0,5	26,1 ± 1,5	1,2 ± 0,4
1 µM	62,0 ± 0,6	9,2 ± 1,7	26,9 ± 1,2	2,0 ± 0,9

2,5 μM	13,1 \pm 1,1	3,6 \pm 0,9	77,8 \pm 0,5	5,5 \pm 1,4
------------------------------	----------------	---------------	----------------	---------------

7.3.3 Estudio de posibles blancos moleculares

7.3.3.1 Proteínas sobre-reguladas

Tabla 20. Análisis de enriquecimiento GO de las proteínas sobre-expresadas luego del tratamiento con CuHL1. Los porcentajes de representación de cada categoría fueron determinados como el porcentaje sobre el total de las proteínas diferencialmente expresadas.

Procesos biológicos	Porcentaje	Proteínas
Respuesta a proteínas no plegadas	22,2	DNAJB1, HSPH1, BAG3, DNAJB4, CTH, HSPA1B
Plegamiento de proteínas	18,5	DNAJB1, HSPH1, BAG3, DNAJB4, HSPA1B
Proceso metabólico del ATP	18,5	SDHA, ATP5O, COX5A, PKM, HSPA1B
Regulación de la respuesta celular al calor	14,8	DNAJB1, HSPH1, BAG3, HSPA1B
Replegamiento de proteínas dependiente de cofactores de chaperonas	14,8	DNAJB1, HSPH1, DNAJB4, HSPA1B

Componentes celulares	Porcentaje	Proteínas
Citoplasma	100	CYP51A1, C12orf5, TXNL1, AARS2, DNAJB1, CCNB1, CARS2, RAB21, SDHA, CDV3, LPCAT1, DDAH1, ATP5O, S100P, COX5A, HSPH1, PKM, BAG3, DNAJB4, CTH, HSPA1B, ATP6V1C1, POLD1, VPS52, GFM1, RAD23A, CHMP2A
Organela delimitada por membrana	96.3	CYP51A1, C12orf5, TXNL1, AARS2, DNAJB1, CCNB1, CARS2, RAB21, SDHA, LPCAT1, DDAH1, ATP5O, S100P, COX5A, HSPH1, PKM

Citosol	66.7	C12orf5, TXNL1, DNAJB1, CCNB1, RAB21, CDV3, DDAH1, HSPH1, PKM, BAG3, DNAJB4, CTH, HSPA1B, ATP6V1C1, POLD1, VPS52, RAD23A, CHMP2A
Mitocondria	37.0	C12orf5, AARS2, CCNB1, CARS2, SDHA, ATP5O, COX5A, PKM, HSPA1B, GFM1
Agresoma	11.1	BAG3, HSPA1B, POLD1

Tabla 21. Análisis de enriquecimiento GO de las proteínas sobre-expresadas luego del tratamiento con CuHL2. Los porcentajes de representación de cada categoría fueron determinados como el porcentaje sobre el total de las proteínas diferencialmente expresadas.

Procesos biológicos	Porcentaje	Proteínas
Respuesta al estrés	57,9	C12orf5, DNAJB1, CCNB1, DDB2, HSPH1, CASP8, BAG3, DNAJB4, CTH, HSPA1B, USP47
Respuesta a proteínas no plegadas	31,6	DNAJB1, HSPH1, BAG3, DNAJB4, CTH, HSPA1B
Replegamiento de proteínas dependiente de cofactores de chaperonas	21,1	DNAJB1, HSPH1, DNAJB4, HSPA1B
Regulación de la respuesta celular al calor	21,1	DNAJB1, HSPH1, BAG3, HSPA1B
Proceso metabólico del ATP	21,1	ATP5O, ATP5C1, ATP5F1, HSPA1B

Funciones moleculares	Porcentaje	Proteínas
Actividad regulatoria de ATPasa	21,1	DNAJB1, HSPH1, BAG3, DNAJB4
Actividad bifosfoglicerato fosfatasa	10,5	C12orf5, MINPP1

Componentes celulares	Porcentaje	Proteínas
Complejo ATP sintasa transportador de protones mitocondrial	15,8	ATP5O, ATP5C1, ATP5F1

7.3.3.2 Proteínas sub-reguladas

Tabla 22. Análisis de enriquecimiento GO de las proteínas sub-expresadas luego del tratamiento con CuHL2. Los porcentajes de representación de cada categoría fueron determinados como el porcentaje sobre el total de las proteínas diferencialmente expresadas.

Funciones moleculares	Porcentaje	Proteínas
Actividad catalítica	90,9	NADK2, MPI, IVD, SDHA, GFM1, AARS2, TUBB2B, TXNL1, ACSF3, DHFR
Unión a nucleótido	72,7	NADK2, IVD, SDHA, GFM1, AARS2, TUBB2B, ACSF3, DHFR
Unión a anión	72,7	NADK2, IVD, SDHA, GFM1, AARS2, TUBB2B, ACSF3, DHFR

Componentes celulares	Porcentaje	Proteínas
Mitocondria	63,6	NADK2, IVD, SDHA, GFM1, AARS2, ACSF3, DHFR

8 REFERENCIAS

1. Hanahan, D.; Weinberg, R. Hallmarks of Cancer The Next Generation. *Cell* **2011**, *144*, 646–674.
2. Hanahan, D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discov.* **2022**, *12*, 31–46.
3. Reya, T.; Morrison, S. J.; Clarke, M. F.; Weissman, I. L. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* **2001**, *414*, 105–111.
4. Hassanpour, S. H.; Dehghani, M. Review of cancer from perspective of molecular. *J. Cancer Res. Pract.* **2017**, *4*, 127–129.
5. OMS <<https://www.who.int>>.
6. Global Cancer Observatory.
7. Onesti, C. E.; Tagliamento, M.; Curigliano, G.; Harbeck, N.; Bartsch, R.; Wildiers, H.; Tjan-Heijnen, V.; Martin, M.; Rottey, S.; Generali, D.; et al. Expected Medium- and Long-Term Impact of the COVID-19 Outbreak in Oncology. *JCO Glob. Oncol.* **2021**, *7*, 162–172.
8. Bernabe-Ramirez, C.; Velazquez, A. I.; Olazagasti, C.; Decat Bergerot, C.; Bergerot, P. G.; Corona Cruz, J.; Riano, I.; Adaniel, C.; Ramirez, F.; Anampa, J.; et al. HOLA COVID-19 Study: Evaluating the Impact of Caring for Patients With COVID-19 on Cancer Care Delivery in Latin America. *JCO Glob. Oncol.* **2022**, *8*.
9. Bozovich, G. E.; Alves De Lima, A.; Fosco, M.; Burgos, L. M.; Martínez, R.; Dupuy De Lôme, R.; Torn, A.; Mercado, J. S. Daño Colateral De La Pandemia Por Covid-19 EnCentros Privados De Salud De Argentina. *Med. (Buenos Aires)* **2020**, *80*, 37–41.
10. childhood cancer statistics <<https://cancerstatisticscenter.cancer.org/#!/childhood-cancer>>.
11. *Registro Oncopediátrico Argentino*; 2016.
12. Harrison, D. J.; Geller, D. S.; Gill, J. D.; Lewis, V. O.; Gorlick, R. Current and future therapeutic approaches for osteosarcoma. *Expert Rev. Anticancer Ther.* **2018**, *18*, 39–50.

13. Aljubran, A. H.; Griffin, A.; Pintilie, M.; Blackstein, M. Osteosarcoma in adolescents and adults: survival analysis with and without lung metastases. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* **2009**, *20*, 1136–1141.
14. Ferguson, J. L.; Turner, S. P. Bone cancer: Diagnosis and treatment principles. *Am. Fam. Physician* **2018**, *98*, 205–213.
15. Tratamiento osteosarcoma <https://www.cancer.gov/espanol/tipos/hueso/pro/tratamiento-osteosarcoma-pdq#_29>.
16. Moreno, F.; Cacciavillano, W.; Cipolla, M.; Coirini, M.; Streitenberger, P.; López Martí, J.; Palladino, M.; Morici, M.; Onoratelli, M.; Drago, G.; et al. Childhood osteosarcoma: Incidence and survival in Argentina. Report from the National Pediatric Cancer Registry, ROHA Network 2000–2013. *Pediatr. Blood Cancer* **2017**, *64*.
17. Waks, A. G.; Winer, E. P. Breast Cancer Treatment: A Review. *JAMA* **2019**, *321*, 288–300.
18. INC incidencia cáncer de mama <<https://www.argentina.gob.ar/salud/instituto-nacional-del-cancer/estadisticas/incidencia>>.
19. Sherr, C. J.; Bartek, J. Cell Cycle–Targeted Cancer Therapies. <https://doi.org/10.1146/annurev-cancerbio-040716-075628> **2017**, *1*, 41–57.
20. Otto, T.; Sicinski, P. Cell cycle proteins as promising targets in cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* **2017**, *17*, 93–115.
21. Ozaki, T.; Nakagawara, A. Role of p53 in Cell Death and Human Cancers. *Cancers* **2011**, *3*, 994–1013.
22. Wong, R. S. Y. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **2011**, *30*.
23. McQuitty, R. J. Metal-based Drugs. <https://doi.org/10.3184/003685014X13898980185076> **2014**, *97*, 1–19.
24. Wang, X.; Wang, X.; Jin, S.; Muhammad, N.; Guo, Z. Stimuli-Responsive Therapeutic Metallodrugs. *Chem. Rev.* **2019**, *119*, 1138–1192.

25. Baran, E. J. Metalofármacos: Una nueva perspectiva para la farmacología y la medicina. *An. Acad. Nac. Cs. Ex., Fís. y Nat.* **2014**, *66*, 5–21.
26. Deng, J.; Yu, P.; Zhang, Z.; Wang, J.; Cai, J.; Wu, N.; Sun, H.; Liang, H.; Yang, F. Designing anticancer copper(II) complexes by optimizing 2-pyridine-thiosemicarbazone ligands. *Eur. J. Med. Chem.* **2018**, *158*, 442–452.
27. Balsa, L. M.; Baran, E. J.; León, I. E. Copper complexes as antitumor agents: in vitro and in vivo evidences. *Curr. Med. Chem.* **2023**, *30*, 510–557.
28. Gracia-Mora, I.; Ruiz-Ramírez, L.; Gómez-Ruiz, C.; Tinoco-Méndez, M.; Márquez-Quiñones, A.; Lira, L. R. De; Marín-Hernández, Á.; Macías-Rosales, L.; Bravo-Gómez, M. E. Knigth'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* **2001**, *8*, 19–28.
29. Su, X.; Aprahamian, I. Hydrazone-based switches, metallo-assemblies and sensors. *Chem. Soc. Rev.* **2014**, *43*, 1963–1981.
30. Popiołek, Ł. MEDICINAL CHEMISTRY RESEARCH Hydrazone-hydrazones as potential antimicrobial agents: overview of the literature since 2010. *Med Chem Res* **2017**, *26*, 287–301.
31. Shakdofa, M. M. E.; Shtaiwi, M. H.; Morsy, N.; Abdel-Rassel, T. M. A. Metal complexes of hydrazones and their biological, analytical and catalytic applications: A review. *Main Gr. Chem.* **2014**, *13*, 187–218.
32. Rodríguez, M. R.; Balsa, L. M.; Piro, O. E.; Etcheverría, G. A.; García-Tojal, J.; Pis-Diez, R.; León, I. E.; Parajón-Costa, B. P.; González-Baró, A. C. Synthesis, Crystal Structure, Spectroscopic Characterization, DFT Calculations and Cytotoxicity Assays of a New Cu(II) Complex with an Acylhydrazone Ligand Derived from Thiophene. *Inorganics* **2021**, *9*, 9.
33. Balsa, L. M.; Ferraresi-Curotto, V.; Lavecchia, M. J.; Echeverría, G. A.; Piro, O. E.; García-Tojal, J.; Pis-Diez, R.; González-Baró, A. C.; León, I. E. Anticancer activity of a new copper(II) complex with a hydrazone ligand. Structural and spectroscopic characterization, computational simulations and cell mechanistic studies on 2D and 3D breast cancer cell models. *Dalt. Trans.* **2021**, *50*, 9812–9826.

34. Burgos-Lopez, Y.; Del Plá, J.; Balsa, L. M.; León, I. E.; Echeverría, G. A.; Piro, O. E.; García-Tojal, J.; Pis-Diez, R.; González-Baró, A. C.; Parajón-Costa, B. S. Synthesis, crystal structure and cytotoxicity assays of a copper(II) nitrate complex with a tridentate ONO acylhydrazone ligand. Spectroscopic and theoretical studies of the complex and its ligand. *Inorganica Chim. Acta* **2019**, *487*, 31–40.
35. Rodríguez, M. R.; Del Plá, J.; Balsa, L. M.; León, I. E.; Piro, O. E.; Echeverría, G. A.; García-Tojal, J.; Pis-Diez, R.; Parajón-Costa, B. S.; González-Baró, A. C. Cu(ii) and Zn(ii) complexes with a poly-functional ligand derived from: O -vanillin and thiophene. Crystal structure, physicochemical properties, theoretical studies and cytotoxicity assays against human breast cancer cells. *New J. Chem.* **2019**, *43*, 7120–7129.
36. Rodríguez, M. R.; Del Plá, J.; Piro, O. E.; Echeverría, G. A.; Espino, G.; Pis-Diez, R.; Parajón-Costa, B. S.; González-Baró, A. C. Structure, tautomerism, spectroscopic and DFT study of o-vanillin derived Schiff bases containing thiophene ring. *J. Mol. Struct.* **2018**, *1165*, 381–390.
37. Cailleau, R.; Young, R.; Olivé, M.; Reeves, W. J. Breast tumor cell lines from pleural effusions. *J. Natl. Cancer Inst.* **1974**, *53*, 661–674.
38. Soule, H. D.; Vazquez, J.; Long, A.; Albert, S.; Brennan, M. A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma^{1,2}. *J. Natl. Cancer Inst.* **1973**, *51*, 1409–1416.
39. Billiau, A.; Edy, V. G.; Heremans, H.; Van Damme, J.; Desmyter, J.; Georgiades, J. A.; De Somer, P. Human interferon: mass production in a newly established cell line, MG 63. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1977**, *12*, 11–15.
40. Mohseny, A. B.; Hogendoorn, P. C. W.; Cleton-Jansen, A. M. Osteosarcoma models: From cell lines to zebrafish. *Sarcoma* **2012**, *2012*, 11.
41. Giard, D. J.; Aaronson, S. A.; Todaro, G. J.; Arnstein, P.; Kersey, J. H.; Dosik, H.; Parks, W. P. In Vitro Cultivation of Human Tumors: Establishment of Cell Lines Derived From a Series of Solid Tumors². *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* **1973**, *51*, 1417–1423.
42. Lieber, M.; Todaro, G.; Smith, B.; Szakal, A.; Nelson-Rees, W. A continuous tumor-cell line from a human lung carcinoma with properties of type II alveolar epithelial cells.

Int. J. Cancer **1976**, *17*, 62–70.

43. Earle, W. R.; Schilling, E. L.; Stark, T. H.; Straus, N. P.; Brown, M. F.; Shelton, E. IV. The mouse fibroblast cultures and changes seen in the living cells. *J. Natl. Cancer Inst.* **1943**, *4*, 165–212.

44. Soule, H. D.; Maloney, T. M.; Wolman, S. R.; Brenz, R.; Russo, J.; Pauley, R. J.; Jones, R. F.; Brooks, S. C.; McGrath, C. M. Isolation and Characterization of a Spontaneously Immortalized Human Breast Epithelial Cell Line, MCF-10. *Cancer Res.* **1990**, *50*, 6075–6086.

45. Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* **1983**, *65*, 55–63.

46. Franken, N. A. P.; Rodermond, H. M.; Stap, J.; Haveman, J.; van Bree, C. Clonogenic assay of cells in vitro. *Nat. Protoc.* **2006**, *1*, 2315–2319.

47. Luis García-Giménez, J.; González-Álvarez, M.; Liu-González, M.; Macías, B.; Borrás, J.; Alzuet, G. 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-phenantroline. Antitumor activity in human Caco-2 cells and Jurkat T lymphocy. *J. Inorg. Biochem.* **2009**, *103*, 923–934.

48. Topală, T.; Bodoki, A.; Oprean, L.; Oprean, R. Experimental techniques employed in the study of metal complexes-DNA -interactions. *Farmacia* **2014**, *62*, 1049–1061.

49. Kooy, N. W.; Royall, J. A.; Ischiropoulos, H.; Beckman, J. S. Peroxynitrite-mediated oxidation of dihydrorhodamine 123. *Free Radic. Biol. Med.* **1994**, *16*, 149–156.

50. Smith, P. K.; Krohn, R. I.; Hermanson, G. T.; Mallia, A. K.; Gartner, F. H.; Provenzano, M. D.; Fujimoto, E. K.; Goeke, N. M.; Olson, B. J.; Klenk, D. C. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* **1985**, *150*, 76–85.

51. Almond, J. B.; Cohen, G. M. The proteasome: A target novel for cancer chemotherapy. *Leukemia* **2002**, *16*, 433–443.

52. STRING <<https://string-db.org>>.

53. Rampersad, S. N. Multiple applications of Alamar Blue as an indicator of metabolic

- function and cellular health in cell viability bioassays. *Sensors (Basel)*. **2012**, *12*, 12347–12360.
54. Li, W.; Ma, H.; Zhang, J.; Zhu, L.; Wang, C.; Yang, Y. Unraveling the roles of CD44/CD24 and ALDH1 as cancer stem cell markers in tumorigenesis and metastasis. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 1–15.
55. Low, M. L.; Paulus, G.; Dorlet, P.; Guillot, R.; Rosli, R.; Delsuc, N.; Crouse, K. A.; Policar, C. Synthesis, characterization and biological activity of Cu(II), Zn(II) and Re(I) complexes derived from S-benzylthiocarbamate and 3-acetylcoumarin. *BioMetals* **2015**, *28*, 553–566.
56. Santini, C.; Pellei, M.; Gandin, V.; Porchia, M.; Tisato, F.; Marzano, C. Advances in copper complexes as anticancer agents. *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 815–862.
57. Robledo-Cadena, D. X.; Gallardo-Pérez, J. C.; Dávila-Borja, V.; Pacheco-Velázquez, S. C.; Belmont-Díaz, J. A.; Ralph, S. J.; Blanco-Carpintero, B. A.; Moreno-Sánchez, R.; Rodríguez-Enríquez, S. Non-steroidal anti-inflammatory drugs increase cisplatin, paclitaxel, and doxorubicin efficacy against human cervix cancer cells. *Pharmaceuticals* **2020**, *13*, 1–25.
58. Ayoub, N. M.; Al-Shami, K. M.; Alqudah, M. A.; Mhaidat, N. M. Crizotinib, a MET inhibitor, inhibits growth, migration, and invasion of breast cancer cells in vitro and synergizes with chemotherapeutic agents. *Onco. Targets. Ther.* **2017**, *10*, 4869–4883.
59. Journal, A. I.; Haghnavaz, N.; Asghari, F.; Elieh, D.; Komi, A.; Shanehbandi, D.; Baradaran, B.; Kazemi, T. Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology HER2 positivity may confer resistance to therapy with paclitaxel in breast cancer cell lines. **2017**.
60. C, L.; A, E.; PB, C.; K, S. Cancer Stem Cell and Bulk Cancer Cell Active Copper(II) Complexes with Vanillin Schiff Base Derivatives and Naproxen. *Chemistry* **2017**, *23*, 11366–11374.
61. Low, M. L.; Paulus, G.; Dorlet, P.; Guillot, R.; Rosli, R.; Delsuc, N.; Crouse, K. A.; Policar, C. Synthesis, characterization and biological activity of Cu(II), Zn(II) and Re(I) complexes

derived from S-benzylthiocarbamate and 3-acetylcoumarin. *BioMetals* **2015**, *28*, 553–566.

62. Gou, Y.; Zhang, Y.; Qi, J.; Chen, S.; Zhou, Z.; Wu, X.; Liang, H.; Yang, F. Developing an anticancer copper(II) pro-drug based on the nature of cancer cell and human serum albumin carrier IIA subdomain: Mouse model of breast cancer. *Oncotarget* **2016**, *7*, 67004–67019.

63. de Camargo Rone A De Grandis Monize M da Silva Patricia B da Silva Mariana M Santoni Carlos E Eismann Amauri A Menegário Marcia R Cominetti Cleslei F Zanelli Fernando R Pavan Alzir A Batista, M. S.; de Camargo, M. S.; M da Silva Á A A Batista, Á. M.; De Grandis Á M M Santoni Á C F Zanelli Á F R Pavan, R. A.; da Silva, P. B.; Eismann Á A A Menegário, C. E.; Cominetti, M. R. Determination of in vitro absorption in Caco-2 monolayers of anticancer Ru(II)-based complexes acting as dual human topoisomerase and PARP inhibitors. *BioMetals* **32**.

64. Buch, K.; Peters, T.; Nawroth, T.; Sängler, M.; Schmidberger, H.; Langguth, P. Determination of cell survival after irradiation via clonogenic assay versus multiple MTT Assay - A comparative study. *Radiat. Oncol.* **2012**, *7*, 1–6.

65. Erxleben, A. Interactions of copper complexes with nucleic acids. *Coord. Chem. Rev.* **2018**, *360*, 92–121.

66. Lawrence, D.; Vaidyanathan, V. G.; Nair, B. U. Synthesis, characterization and DNA binding studies of two mixed ligand complexes of ruthenium(II). *J. Inorg. Biochem.* **2006**, *100*, 1244–1251.

67. Williams, A. K.; Dasilva, S. C.; Bhatta, A.; Rawal, B.; Liu, M.; Korobkova, E. A. Determination of the drug–DNA binding modes using fluorescence-based assays. *Anal. Biochem.* **2012**, *422*, 66–73.

68. Pervaiz, S. Pro-oxidant milieu blunts scissors: insight into tumor progression, drug resistance, and novel druggable targets. *Curr. Pharm. Des.* **2006**, *12*, 4469–4477.

69. Teppo, H.-R.; Soini, Y.; Karihtala, P. Review Article Reactive Oxygen Species-Mediated Mechanisms of Action of Targeted Cancer Therapy. **2017**.

70. Denoyer, D.; Masaldan, S.; La Fontaine, S.; Cater, M. A. Targeting copper in cancer therapy: "Copper That Cancer." *Metallomics* **2015**, *7*, 1459–1476.
71. Koppenol, W. H. The Haber-Weiss cycle - 70 years later. *Redox Rep.* **2001**, *6*, 229–234.
72. Buchtík, R.; Trávníček, Z.; Vančo, J.; Herchel, R.; Dvořák, Z. Synthesis, characterization, DNA interaction and cleavage, and in vitro cytotoxicity of copper(ii) mixed-ligand complexes with 2-phenyl-3-hydroxy-4(1H)-quinolinone. *Dalt. Trans.* **2011**, *40*, 9404–9412.
73. Borissenko, L.; Groll, M. 20S proteasome and its inhibitors: Crystallographic knowledge for drug development. *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 687–717.
74. Navon, A.; Ciechanover, A. The 26 S proteasome: From basic mechanisms to drug targeting. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 33713–33718.
75. Drexler, H. C. A. Activation of the cell death program by inhibition of proteasome function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1997**, *94*, 855–860.
76. Zhang, Z.; Wang, H.; Yan, M.; Wang, H.; Zhang, C. Novel copper complexes as potential proteasome inhibitors for cancer treatment (Review). *Mol. Med. Rep.* **2017**, *15*, 3–11.
77. Zuo, J.; Bi, C.; Fan, Y.; Buac, D.; Nardon, C.; Daniel, K. G.; Dou, Q. P. Cellular and computational studies of proteasome inhibition and apoptosis induction in human cancer cells by amino acid Schiff base-copper complexes. *J. Inorg. Biochem.* **2013**, *118*, 83–93.
78. ZHANG, X.; CAIFENG BI1; FAN1, Y.; CUI2, Q.; CHEN2, D.; XIAO1, Y.; DOU, Q. P.; 1Key Induction of tumor cell apoptosis by taurine Schiff base copper complex is associated with the inhibition of proteasomal activity XIA. *Int. J. Mol. Med.* **2008**, *22*, 677–682.
79. Xiao, Y.; Bi, C.; Fan, Y.; Cui, C.; Zhang, X.; Dou, Q. P. L-glutamine Schiff base copper complex as a proteasome inhibitor and an apoptosis inducer in human cancer cells. *Int. J. Oncol.* **2008**, *33*, 1073–1079.
80. Wang, Y.; Chiu, J. F. Proteomic Approaches in Understanding Action Mechanisms

of Metal-Based Anticancer Drugs. *Met. Based. Drugs* **2008**, *2008*.

81. Oakes, S. A. Endoplasmic reticulum proteostasis: A key checkpoint in cancer. *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* **2017**, *312*, C93–C102.

82. Walter, P.; Ron, D. The unfolded protein response: From stress pathway to homeostatic regulation. *Science (80-.)*. **2011**, *334*, 1081–1086.

83. Lane, D. P. P53, Guardian of the Genome. *Nature* 1992, *358*, 15–16.

84. Walerych, D.; Napoli, M.; Collavin, L.; Del Sal, G. The rebel angel: Mutant p53 as the driving oncogene in breast cancer. *Carcinogenesis* **2012**, *33*, 2007–2017.

85. Muller, P. A. J.; Caswell, P. T.; Doyle, B.; Iwanicki, M. P.; Tan, E. H.; Karim, S.; Lukashchuk, N.; Gillespie, D. A.; Ludwig, R. L.; Gosselin, P.; et al. Mutant p53 Drives Invasion by Promoting Integrin Recycling. *Cell* **2009**, *139*, 1327–1341.

86. Muller, P. A. J.; Vousden, K. H. Mutant p53 in cancer: New functions and therapeutic opportunities. *Cancer Cell* **2014**, *25*, 304–317.

87. Bae, Y. H.; Shin, J. M.; Park, H. J.; Jang, H. O.; Bae, M. K.; Bae, S. K. Gain-of-function mutant p53-R280K mediates survival of breast cancer cells. *Genes and Genomics* **2014**, *36*, 171–178.

88. Fu, Y.; Zou, T.; Shen, X.; Nelson, P. J.; Li, J.; Wu, C.; Yang, J.; Zheng, Y.; Bruns, C.; Zhao, Y.; et al. Lipid metabolism in cancer progression and therapeutic strategies. *MedComm* **2021**, *2*, 27–59.

89. Broadfield, L. A.; Pane, A. A.; Talebi, A.; Swinnen, J. V.; Fendt, S. M. Lipid metabolism in cancer: New perspectives and emerging mechanisms. *Dev. Cell* **2021**, *56*, 1363–1393.

90. Röhrig, F.; Schulze, A. The multifaceted roles of fatty acid synthesis in cancer. *Nat. Rev. Cancer* **2016**, *16*, 732–749.

91. Kumarakulasingham, M.; Rooney, P. H.; Dundas, S. R.; Telfer, C.; Melvin, W. T.; Curran, S.; Murray, G. I. Cytochrome p450 profile of colorectal cancer: identification of markers of prognosis. *Clin. Cancer Res.* **2005**, *11*, 3758–3765.

92. Mayengbam, S. S.; Singh, A.; Pillai, A. D.; Bhat, M. K. Influence of cholesterol on

- cancer progression and therapy. *Transl. Oncol.* **2021**, *14*, 101043.
93. Martínez-Botas, J.; Ferruelo, A. J.; Suárez, Y.; Gómez-Coronado, D.; Lasunción, M. A. Induction of apoptosis in p53-null HL-60 cells by inhibition of lanosterol 14- α demethylase. *Biochimie* **1998**, *80*, 887–894.
94. Centonze, G.; Natalini, D.; Piccolantonio, A.; Salemme, V.; Morellato, A.; Arina, P.; Riganti, C.; Defilippi, P. Cholesterol and Its Derivatives: Multifaceted Players in Breast Cancer Progression. *Front. Oncol.* **2022**, *12*, 1–16.
95. Wang, C.; Li, P.; Xuan, J.; Zhu, C.; Liu, J.; Shan, L.; Du, Q.; Ren, Y.; Ye, J. Cholesterol Enhances Colorectal Cancer Progression via ROS Elevation and MAPK Signaling Pathway Activation. *Cell. Physiol. Biochem.* **2017**, *42*, 729–742.
96. Gallagher, E. J.; Zelenko, Z.; Neel, B. A.; Antoniou, I. M.; Rajan, L.; Kase, N.; LeRoith, D. Elevated tumor LDLR expression accelerates LDL cholesterol-mediated breast cancer growth in mouse models of hyperlipidemia. *Oncogene* **2017**, *36*, 6462–6471.
97. Lei, M. The MCM Complex: Its Role in DNA Replication and Implications for Cancer Therapy. *Curr. Cancer Drug Targets* **2005**, *5*, 365–380.
98. Zeng, T.; Guan, Y.; Li, Y. kun; Wu, Q.; Tang, X. jun; Zeng, X.; Ling, H.; Zou, J. The DNA replication regulator MCM6: An emerging cancer biomarker and target. *Clin. Chim. Acta.* **2021**, *517*, 92–98.
99. Williams, A. K.; Dasilva, S. C.; Bhatta, A.; Rawal, B.; Liu, M.; Korobkova, E. A. Determination of the drug–DNA binding modes using fluorescence-based assays. *Anal. Biochem.* **2012**, *422*, 66–73.
100. Liu, L.; Mo, J. Y.; Rodriguez-Belmonte, E. M.; Lee, M. Y. W. T. Identification of a fourth subunit of mammalian DNA polymerase delta. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 18739–18744.
101. Kashkin, K.; Chernov, I.; Stukacheva, E.; Monastyrskaya, G.; Uspenskaya, N.; Kopantzev, E.; Sverdlov, E. Cancer specificity of promoters of the genes controlling cell proliferation. *J. Cell. Biochem.* **2015**, *116*, 299–309.
102. Zhang, L.; Yang, W.; Zhu, X.; Wei, C. p53 inhibits the expression of p125 and the

methylation of POLD1 gene promoter by downregulating the Sp1-induced DNMT1 activities in breast cancer. *Onco. Targets. Ther.* **2016**, *9*, 1351–1360.

103. Liang, Z. J.; Wan, Y.; Zhu, D. D.; Wang, M. X.; Jiang, H. M.; Huang, D. L.; Luo, L. F.; Chen, M. J.; Yang, W. P.; Li, H. M.; et al. Resveratrol Mediates the Apoptosis of Triple Negative Breast Cancer Cells by Reducing POLD1 Expression. *Front. Oncol.* **2021**, *11*, 1–15.

104. Hamilton, G.; Rath, B. Applicability of tumor spheroids for in vitro chemosensitivity assays. <https://doi.org/10.1080/17425255.2019.1554055> **2018**, *15*, 15–23.

105. Thoma, C. R.; Zimmermann, M.; Agarkova, I.; Kelm, J. M.; Krek, W. 3D cell culture systems modeling tumor growth determinants in cancer target discovery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2014**, *69–70*, 29–41.

106. Göschl, S.; Schreiber-Brynzak, E.; Pichler, V.; Cseh, K.; Heffeter, P.; Jungwirth, U.; Jakupec, M. A.; Berger, W.; Keppler, B. K. Comparative studies of oxaliplatin-based platinum(IV) complexes in different in vitro and in vivo tumor models. *Metallomics* **2017**, *9*, 309–322.

107. Schreiber-Brynzak, E.; Klapproth, E.; Unger, C.; Lichtscheidl-Schultz, I.; Göschl, S.; Schweighofer, S.; Trondl, R.; Dolznig, H.; Jakupec, M. A.; Keppler, B. K. Three-dimensional and co-culture models for preclinical evaluation of metal-based anticancer drugs. *Invest. New Drugs* **2015**, *33*, 835–847.

108. Ivascu, A.; Kubbies, M. Diversity of cell-mediated adhesions in breast cancer spheroids. *Int. J. Oncol.* **2007**, *31*, 1403–1413.

109. Froehlich, K.; Haeger, J. D.; Heger, J.; Pastuschek, J.; Photini, S. M.; Yan, Y.; Lupp, A.; Pfarrer, C.; Mrowka, R.; Schleußner, E.; et al. Generation of Multicellular Breast Cancer Tumor Spheroids: Comparison of Different Protocols. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* **2016**, *21*, 89–98.

110. Cioce, M.; Gherardi, S.; Viglietto, G.; Strano, S.; Blandino, G.; Muti, P.; Ciliberto, G. Mammosphere-forming cells from breast cancer cell lines as a tool for the identification of CSC-like- and early progenitor-targeting drugs. *Cell Cycle* **2010**, *9*, 2950–2959.

111. Lu, C.; Eskandari, A.; Cressey, P. B.; Suntharalingam, K. Cancer Stem Cell and Bulk Cancer Cell Active Copper(II) Complexes with Vanillin Schiff Base Derivatives and Naproxen. *Chem. - A Eur. J.* **2017**, *23*, 11366–11374.
112. Laws, K.; Bineva-Todd, G.; Eskandari, A.; Lu, C.; O'Reilly, N.; Suntharalingam, K. A Copper(II) Phenanthroline Metallopeptide That Targets and Disrupts Mitochondrial Function in Breast Cancer Stem Cells. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2018**, *57*, 287–291.
113. JN, B.; IJ, M.; PM, B.; PB, C.; MT, H.; K, S. Breast Cancer Stem Cell Potent Copper(II)-Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drug Complexes. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2016**, *55*, 2845–2850.
114. Cadavid-Vargas, J.; Leon, I.; Etcheverry, S.; Santi, E.; Torre, M.; Di Virgilio, A. Copper(II) Complexes with Saccharinate and Glutamine as Antitumor Agents: Cytoand Genotoxicity in Human Osteosarcoma Cells. *Anticancer. Agents Med. Chem.* **2016**, *17*, 424–433.
115. King, A. P.; Wilson, J. J. Endoplasmic reticulum stress: An arising target for metal-based anticancer agents. *Chem. Soc. Rev.* **2020**, *49*, 8113–8136.
116. Johnston, J. A.; Ward, C. L.; Kopito, R. R. Aggresomes: A Cellular Response to Misfolded Proteins. *J. Cell Biol.* **1998**, *143*, 1883.
117. Galber, C.; Acosta, M. J.; Minervini, G.; Giorgio, V. The role of mitochondrial ATP synthase in cancer. *Biol. Chem.* **2020**, *401*, 1199–1214.
118. Santamaría, G.; Martínez-Diez, M.; Fabregat, I.; Cuezva, J. M. Efficient execution of cell death in non-glycolytic cells requires the generation of ROS controlled by the activity of mitochondrial H⁺-ATP synthase. *Carcinogenesis* **2006**, *27*, 925–935.
119. Bernardi, P.; Rasola, A.; Forte, M.; Lippe, G. The Mitochondrial Permeability Transition Pore: Channel Formation by F-ATP Synthase, Integration in Signal Transduction, and Role in Pathophysiology. *Physiol. Rev.* **2015**, *95*, 1111–1155.
120. Dickreuter, E.; Cordes, N. The cancer cell adhesion resistome: mechanisms, targeting and translational approaches. *Biol. Chem.* **2017**, *398*, 721–735.
121. Rosa, R.; Monteleone, F.; Zambrano, N.; Bianco, R. In vitro and in vivo models for

analysis of resistance to anticancer molecular therapies. *Curr. Med. Chem.* **2014**, *21*, 1595–1606.

122. Chui, M. H.; Kandel, R. A.; Wong, M.; Griffin, A. M.; Bell, R. S.; Blackstein, M. E.; Wunder, J. S.; Dickson, B. C. Histopathologic Features of Prognostic Significance in High-Grade Osteosarcoma. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **2016**, *140*, 1231–1242.

123. Arunachalam, H. B.; Mishra, R.; Daescu, O.; Cederberg, K.; Rakheja, D.; Sengupta, A.; Leonard, D.; Hallac, R.; Leavey, P. Viable and necrotic tumor assessment from whole slide images of osteosarcoma using machine-learning and deep-learning models. *PLoS One* **2019**, *14*.