



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

Trabajo de Tesis Doctoral

**Metalofármacos de cobre, platino y vanadio. Potencial
actividad antitumoral y estudios de mecanismos de
acción en modelos *in vitro* e *in vivo***

Lic. Ignacio E. León

Director: Prof. Dra. Susana B. Etcheverry
Codirector: Dra. Ana L. Di Virgilio

2015

El presente trabajo de Tesis para optar al grado de Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas, fue realizado en la Cátedra de Bioquímica Patológica del Departamento de Ciencias Biológicas y en el CEQUINOR del Departamento de Química, de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata, bajo la dirección de la Prof. Dra. Susana B. Etcheverry y la codirección de la Dra. Ana L. Di Virgilio.

Año 2015

Agradecimientos

Por la presente quisiera agradecerles a las instituciones y personas que ayudaron directa o indirectamente a la realización de este trabajo de Tesis Doctoral

-A la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata por haberme formado académicamente.

-Al Director del CEQUINOR, Prof. Dr. Dr. Carlos O. Della Védova por permitirme desarrollar este trabajo de Tesis Doctoral en el CEQUINOR.

-A la ANPCyT y al CONICET por otorgarme las becas de inicio y finalización de Doctorado) para el desarrollo del presente trabajo de Tesis Doctoral.

-A la ANPCyT, CONICET, UNLP, UMB y AMSUD PASTEUR por el otorgamiento de subsidios y fondos necesarios para llevar a cabo las tareas de investigación.

-A mi directora la Prof Dra Susana B. Etcheverry (“NENÉ”) por enseñarme entre muchísimas cosas científicas, académicas, éticas y morales, que es mucho más importante ser un buen tipo que un buen investigador.

-A mi codirectora la Dra Ana L. Di Virgilio por su paciencia, confianza, ayuda y sus enseñanzas dentro y fuera del laboratorio.

-A los “colaboradores eternos” (Enrique Baran (CEQUINOR, UNLP), Cecilia Muglia (LISIN, UNLP), Daniel Barrio (UNRN), Mariela Bollati-Fogolin (IPMON), Natalia Mercer y Gerardo Vasta (UMB) por su gran aporte para con este trabajo de tesis.

-A Naso y a Islas (se entiende que son Luciana y Soledad) por ser excelentes compañeras dentro y fuera del laboratorio a pesar de todo y por la amistad que tanto valoro.

- A el gran Juan Fernando Cadavid Vargas (nombre de telenovela) por su ayuda, sus consejos y su gran compañerismo en el laboratorio.

-A Martín y Vero por su ayuda en todos los aspectos a lo largo de estos años.

-Al comité de Brujas del CEQUINOR y anexos: Bea, Betty, Eli, Evelina, Patricia, Sonia, Anita, Carlitos y Pili, por todos los momentos, mediodías y tortas compartidas.

-A los becarios del CEQUINOR (LDD, LDT, LQT, gases, el 32 y el 12), por las charlas de pasillo y por los momentos compartidos.

-A toda la gente del Bioterio de la Facultad de Ciencias Veterinarias, UNLP (Cecilia, Fabri, Miguel, Clara, Agustina) por su buena onda, sus consejos y por facilitarme todo los medios para realizar los ensayos in vivo obtenidos en esta tesis.

-Al grupo de la Unidad de Biología Celular (Inés, Karen, Romina, Sabina, Valentina, Soledad), Institut Pasteur, Montevideo (IPMON) por su cálido recibimiento en mis dos estadías en tierras uruguayas.

-Al grupo del Prof. Dr Vasta (Nuria, Justin, Chiguang, Gargi, Aditi, Graeme) de la Escuela de Medicina de la Universidad de Maryland (UMB), USA por los gratos momentos vividos con mundial de futbol incluido, en mi estadía en Estados Unidos.

-A Nataliya Butenko e Isabel Cavaco, Universidad de Algarve, Portugal por su colaboración en los trabajos incluidos en esta tesis doctoral de interacción con ADN plasmídico

-A la Dra Gabriela Egusquiza y la Dra Carmen Cabello por facilitarme las muestras relacionadas con los polioxometalatos desarrollados en esta tesis doctoral.

-A el Dr Gabriel Arrambide y la Prof. Dra Dinorah Gambino por facilitarme las muestras relacionadas con los compuestos de vanadio(V) desarrollados en esta tesis doctoral.

-A la Dra Maria V. Delpino, UBA por facilitarme la línea celular MG-63 con la cual desarrolle la tesis doctoral

-A el Dr Miguel Reigosa, IMBICE, por su colaboración en el cultivo de linfocitos derivados de sangre periférica.

-A la gente del LISIN (coqui, David, Nicolas, Paula, Juan, Lucia, loly, etc) por su buena onda y por facilitarme el uso de todos sus equipos.

-A mis amigos (GS, GSM, Fantastic, Ferrua, Charly, Martin, lampre, Rubén)

-A mi familia, fieles peregrinos de este viaje.

-Al glorioso Club Atlético Independiente, porque arrancó siendo una tesis de la A y termina siendo de la A.

Índice

1. Introducción.....	1
1.1 Metalofarmacos: usos y aplicaciones	2
1.2 Ligandos.....	2
1.2.1 Flavonoides.....	2
1.2.2 Hidroxiquinolinas.....	3
1.2.3 Ligandos donores de oxígeno.....	4
1.2.4 Ligandos heterocíclicos.....	4
1.3 Polioxometalatos: generalidades.....	5
1.3.1. Aplicaciones bioquímicas y farmacológicas.....	6
1.3.1.1 Aplicaciones analíticas.....	6
1.3.1.2 Actividad farmacológica.....	6
1.4 Platino: Historia y generalidades.....	7
1.4.1 Ensayos clínicos del cis-[Pt(NH ₄) ₂ Cl ₂]	8
1.4.2 Uso de drogas de platino como potenciadores de Radioterapia.....	8
1.4.3 Compuestos de platino de segunda generación: Ensayos clínicos y estado actual.....	9
1.4.4 Mecanismos de acción.....	10
1.5 Vanadio: Descubrimiento y generalidades.....	10
1.5.1 Entrada, absorción, excreción y almacenamiento del vanadio	11
1.5.2 Propiedades químicas y bioquímicas del vanadio.....	12
1.5.2.1 Química del vanadio(IV) en solución.....	13
1.5.2.2 Química del vanadio(V) en solución.....	14
1.5.3 Propiedades farmacológicas e importancia terapéutica del vanadio.....	15
1.5.4 Importancia de la complejación del vanadio.....	16
1.5.5 Efectos biológicos del vanadio sobre células en cultivo.....	16
1.5.5.1 Efectos insulinoimiméticos. Mecanismos de acción.....	16
1.5.5.2 Efectos antitumorales del vanadio.....	18
1.5.5.2.1 Especies de oxígeno y nitrógeno reactivas (ROS y RN).....	20
1.5.5.2.2 Daño oxidativo a biomoléculas.....	21
1.5.5.2.3 Estrés oxidativo y sistemas antioxidantes.....	23
1.5.5.2.4 Generación de estrés oxidativo por acción del vanadio.....	24
1.5.5.2.5 Efectos del vanadio sobre el ciclo y la proliferación celular.....	25
1.5.5.2.6 Efectos del vanadio sobre la muerte celular programada (apoptosis).....	27
1.5.5.2.7 Potencial antimetastásico del vanadio.....	28
1.5.6 Efectos antitumorales del vanadio sobre animales de experimentación..	29
1.5.7 El vanadio en el hueso.....	30
1.6 Fisiología de los osteoblastos.....	30
1.6.1 Modelos de células de tipo osteoblasto murino y humano.....	31
1.7 Cáncer	
1.7.1 Definición y tipos de cáncer	32
1.7.2 Características del cáncer	32
1.7.3 Epidemiología del cáncer	32
1.7.4 Osteosarcoma y terapia antitumoral.....	33

1.8. Galectinas	
1.8.1 Aspectos generales y clasificación	33
1.8.2 Galectina-1 (y Galectina-3 : efectos biológicos y su relación con el cáncer	35
1.8.3 Galectinas y biometales	36
2. Objetivos	37
3. Resultados	39
3.1. Estabilidad en solución	40
3.2 Heteropolioxometalatos (HPOMs): estudio de la actividad biológica de una isoserie [(PW₉O₃₄)₂M₄]¹⁰⁻ con M=Cu(II), Mn(II), Co(II), Zn(II) en células de osteosarcoma humano MG-63 en cultivo	40
3.2.1 Estudios de viabilidad celular	40
3.2.1.1 Ensayo del Cristal violeta en células de osteosarcoma humano (MG-63)	40
3.2.1.2 Efectos de PW₉Cu sobre otras líneas osteoblásticas tumorales y normales	41
3.2.1.3 Efectos de PW₉Cu sobre la actividad lisosomal y mitocondrial	42
3.2.2 Cambios morfológicos	
3.2.2.1 Tinción con sondas fluorescentes	43
3.2.3 Mecanismos de acción	44
3.2.3.1 Estrés oxidativo	
3.2.3.1.1 Generación de especies reactivas del oxígeno (ROS)	44
3.2.3.1.2 Estudios de viabilidad celular en presencia de scavengers de ROS	45
3.2.3.2 Balance redox	
3.2.3.2.1 Status redox celular	46
3.2.3.2.2 Estudios de viabilidad celular en presencia de GSH	47
3.2.3.3 Apoptosis	47
3.2.3.4 Estudio del arresto sobre las fases del ciclo celular	48
3.2.3.5. Rol de las galectinas 1 y 3 (Gal 1 y Gal 3) en los mecanismos de muerte celular	49
3.2.3.5.1 Análisis de los cambios en la expresión de Gal 1 y Gal 3	49
3.3 Compuestos de platino: estudio de la actividad biológica de dos complejos de platino(II) con ligandos derivados de 8 aminoquinolina (CR-163) y 8-hidroxiquinolina (CR-175) en células de osteosarcoma humano MG-63 en cultivo	51
3.3.1 Efectos de CR-163 y CR-175 sobre la viabilidad celular	52
3.3.2 Genotoxicidad	54
3.3.3 Mecanismos de acción	55
3.3.3.1 Estrés oxidativo	55
3.3.3.2 Apoptosis	55
3.3.3.3 Clivaje de ADN plasmídico (pA1)	57
3.4 Vanadio	
3.4.1 Vanadio (V): Complejos de oxovanadio(V) con hidroxilamido-aminoácidos, con metionina [VO(NH₂O)₂(met)] y con valina [VO(NH₂O)₂(val)]	58
3.4.1.1. Estudios de viabilidad celular	
3.4.1.1.1 Ensayo del Cristal violeta	59

3.4.1.1.2 Efectos de [VO(NH ₂ O) ₂ (met)] y [VO(NH ₂ O) ₂ (val)] sobre la actividad mitocondrial.....	60
3.4.1.2 Cambios morfológicos	
3.4.1.2.1 Tinción con Giemsa.....	60
3.4.1.3 Genotoxicidad.....	61
3.4.1.3.1 Detección de micronúcleos	61
3.4.1.3.2. Detección de daño en el ADN a través del ensayo de cometa..	62
3.4.1.4 Mecanismos de acción.....	63
3.4.1.4.1. Estrés oxidativo: Generación de especies reactivas del oxígeno (ROS).....	63
3.4.2 Vanadio (IV)	
3.4.2.1 Complejos del catión vanadilo (IV) con oxodiacetato (oda), VO(oda), con oxodiacetato(oda) y 2,2 bipyridilo (bipy), VO(oda)bipy y con oxodiacetato(oda) y fenantrolina(phen), VO(oda)phen.....	64
3.4.2.1.1 Estudios de viabilidad celular	
3.4.2.1.1.1 Ensayo del Cristal violeta.....	64
3.4.2.1.1.2 Actividad lisosomal y mitocondrial.....	65
3.4.2.1.2 Cambios morfológicos	
3.4.2.1.2.1 Tinción con Giemsa.....	67
3.4.2.1.3 Genotoxicidad.....	68
3.4.2.1.4 Mecanismos de acción.....	69
3.4.2.1.4.1 Estrés oxidativo.....	69
3.4.2.1.4.2 Apoptosis.....	70
3.4.2.1.4.3 Clivaje de ADN plasmídico (pA1).....	71
3.4.2.2 Complejos de oxovanadio(IV) con los flavonoides crisina y silibinina: [VO(crisina) ₂ EtOH] ₂ (VOcris) y Na ₂ [VO(silibinina) ₂].6H ₂ O (VOSil).....	73
Estudios realizados en la línea celular de Osteosarcoma humano (MG-63).....	73
3.4.2.2.1 Estudios de viabilidad celular.....	73
3.4.2.2.1.1 Ensayo del cristal violeta.....	73
3.4.2.2.1.1.1 Comparación de los efectos antiproliferativos en líneas celulares osteoblásticas.....	75
3.4.2.2.1.2 Efectos de VOcris y VOSil sobre la actividad lisosomal y mitocondrial.....	76
3.4.2.2.1.2.1 Estudios realizados en células mononucleares de sangre periférica humana.....	78
3.4.2.2.2 Cambios morfológicos: tinción con sondas fluorescentes.....	78
3.4.2.2.3 Genotoxicidad.....	79
3.4.2.2.3.1. Detección de micronúcleos.....	79
3.4.2.2.3.2. Detección de daño en el ADN a través del ensayo de cometa.....	80
3.4.2.2.4 Mecanismos de acción.....	81
3.4.2.2.4.1 Estrés oxidativo.....	81
3.4.2.2.4.1.1 Estudios de viabilidad celular en presencia de scavengers de ROS.....	82
3.4.2.2.4.2 Balance redox.....	83
3.4.2.2.4.2.1 Status redox celular.....	83

3.4.2.2.4.2.2 Estudios de viabilidad celular en presencia de GSH.....	84
3.4.2.2.4.3 Apoptosis.....	85
3.4.2.2.4.3.1 Estudio de la externalización del residuo de Fosfatidilserina (PS) por anexina V.....	85
3.4.2.2.4.3.2 Activación de caspasa-3.....	88
3.4.2.2.4.3.3 Análisis del ciclo celular y fragmentación del ADN...	89
3.4.2.2.4.4 Rol de las galectinas 1 y 3 (Gal 1 y Gal 3) en los mecanismos de muerte celular	
3.4.2.2.4.4.1 Análisis de los cambios en la expresión de Gal 1 y Gal 3.....	91
3.4.2.2.4.4.2 Análisis de los cambios en la expresión de Neuraminidasa 1 y 3.....	92
3.4.2.2.4.4.3 Análisis de la secreción de Gal 1 y Gal 3.....	93
3.4.2.2.4.4.4. Estudio de la exposición de azúcares en superficie utilizando lectinas comerciales.....	95
3.4.2.2.4.4.4.1 ELISA.....	95
3.4.2.2.4.4.4.2 Citometría de flujo.....	96
3.4.2.2.4.4.5 Estudio de los efectos pro-apoptóticos de las galectinas 1 y 3 exógenas.....	97
3.4.2.2.4.4.6 Estudio de la muerte celular programada por una terapia combinada entre VOcris y galectina 1 y 3 exógena.....	99
3.4.2.2.5 Estudios realizados desarrollando matrices poliméricas con aplicación en la terapia antitumoral en la línea celular de Osteosarcoma humano (MG-63)	101
3.4.2.2.6 Estudios realizados <i>in vivo</i>	103
3.4.2.2.6.1 Generación y establecimiento de un modelo animal murino N:NIH(S) Fox1 ^{nu} xenotransplantado con la línea celular de osteosarcoma humano MG-63.....	103
3.4.2.2.6.2 Evaluación de la capacidad antitumoral del complejo VOcris en ratones inmunodeficientes N:NIH(S) Fox1 ^{nu} inoculados con la línea tumoral de osteosarcoma humano MG-63.....	104
3.4.2.2.6.3 Toxicidad del complejo VOcris.....	105
Estudios realizados en la línea celular de Adenocarcinoma colorectal humano (HT-29) y la misma línea transfectada con el gen del <i>NFκB</i> (HT-29 NFκB-hrGFP).....	106
3.4.2.2.7 Estudios de viabilidad celular.....	106
3.4.2.2.7.1 Ensayo del cristal violeta en HT-29.....	106
3.4.2.2.7.2 Efectos de VOcris y VOsil sobre la actividad mitocondrial en células HT-29.....	106
3.4.2.2.7.3 Mecanismos de acción.....	107
3.4.2.2.7.3.1. Balance redox: Status redox celular.....	107
3.4.2.2.7.3.2. Inhibición de la actividad de la enzima topoisomerasa IB.....	108
3.4.2.2.7.3.3. Apoptosis.....	111

.4.2.2.7.3.3.1 Estudio de la externalización del residuo de Fosfatidilserina (PS) por anexina V.....	111
3.4.2.2.7.3.3.2 Activación de caspasa-3.....	112
3.4.2.2.7.3.3.3 Análisis del ciclo celular y fragmentación del ADN.....	113
3.4.2.2.7.3.4. Estudio de la inhibición de la vía de NFκB activada por TNF utilizando la línea transfectada HT-29 NFκB-hrGFP.....	115
4. Discusión.....	117
4.1 Heteropolioxometalatos (HPOMs) con cobre: PW ₉ Cu.....	119
4.2 Complejos de platino: CR-163 y CR 175.....	122
4.3 Complejos de Vanadio(V): VO(NH ₂ O) ₂ (met) y con valina [VO(NH ₂ O) ₂ (val)].....	124
4.4 Complejos de Vanadio(IV)	125
4.4.1 VO(oda), VO(oda)bipy y VO(oda)phen.....	125
4.4.2 VOsil y VOcris.....	128
5. Conclusiones.....	142
6. Metodología.....	145
6.1 Síntesis de Polioxometalatos.....	146
6.2 Síntesis de los compuestos de platino.....	146
6.3 Síntesis de los compuestos de vanadio.....	147
6.3.1 Vanadio (V)	147
6.3.1.1 [VO(NH ₂ O) ₂ (aa)]	147
6.3.2 Vanadio (IV)	147
6.3.2.1 [VO(oda)] 2H ₂ O , [VO(oda)(bipy)]·H ₂ O y [VO(oda)(phen)]·1.5H ₂ O.....	147
6.3.2.2 [VO(crisina) ₂ EtOH] ₂	147
6.3.2.3 Na ₂ [VO(silibinina) ₂] 6H ₂ O.....	148
6.4 Ensayos de solubilidad	148
6.5 Estudios de estabilidad.....	148
6.6 Ensayos <i>in vitro</i>	149
6.6.1 Cultivos Celulares.....	149
6.6.1.1 MC3T3-E1.....	149
6.6.1.2 UMR106.....	149
6.6.1.3 MG-63.....	149
6.6.1.4 HT-29.....	149
6.6.1.5 HT-29-NFκB-hrGFP.....	149
6.6.1.6 Células mononucleares de sangre periférica.....	149
6.6.2 Condiciones de cultivo	150
6.7 Ensayos de viabilidad celular y citotoxicidad.....	150
6.7.1 Ensayo del cristal violeta.....	150
6.7.2 Estudio de la funcionalidad mitocondrial. Ensayo de MTT.....	150
6.7.3 Ensayo de Rojo neutro.	151
6.7.4 Estudios morfológicos.....	151
6.8 Ensayos de genotoxicidad	
6.8.1. Estudios de fragmentación de ADN. Ensayo Cometa.....	151
6.8.2. Ensayo de micronúcleos (MN).....	152

6.9 Estudio de los mecanismos de acción.....	152
6.9.1 Clivaje de ADN plasmídico en geles de agarosa.....	152
6.9.2 Inhibición de la actividad de la htopoisomerasa IB.....	153
6.9.3 Estrés oxidativo.....	153
6.9.4 Estudio del status redox celular a través de la medición de la relación de glutation reducido (GSH) y oxidado (GSSG).....	154
6.9.5 Análisis de arresto del ciclo celular.....	154
6.9.6 Estudios de Apoptosis	
6.9.6.1 Evaluación de la morfología apoptótica.....	155
6.9.6.2 Evaluación de la externalización de fosfatidil serina.....	155
6.9.6.3 Evaluación del contenido de ADN (pico Sub-G1) en el análisis del ciclo celular.....	155
6.9.6.4 Análisis de activación de caspasa-3.....	155
6.9.6.5 Potencial de membrana mitocondrial.....	156
6.9.7 Análisis de la expresión de galectina-1 (Gal 1) y galectina-3 (Gal 3).....	156
6.9.7.1 Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR).....	156
6.9.7.2 Western Blot.....	157
6.9.8 Análisis de la secreción de Gal 1 y Gal 3.....	157
6.9.9 Análisis de unión a azúcares de superficie usando lectinas comerciales.....	158
6.9.10 Determinación de la muerte celular inducida por Gal 1 y Gal 3 recombinante.....	158
6.9.11 Ensayo de inhibición de la vía NF-κB utilizando la línea celular HT-29-NFκB-hrGFP.....	159
6.10 Desarrollo de matrices poliméricas para la liberación controlada de fármacos.....	159
6.11 Metodología específica utilizada en animales (Ensayos <i>in vivo</i>).....	160
6.11.1 Mantenimiento de los animales.....	160
6.11.2 Bioética.....	160
6.11.3 Desarrollo y establecimiento de un modelo animal murino N:NIH(S) Fox1 ^{nu} xenotransplantado con la línea celular de osteosarcoma humano MG-63.....	160
6.11.4 Medición de las dimensiones tumorales.....	161
6.11.5 Evaluación de los efectos antitumorales <i>in vivo</i> por metalodrogas en el modelo murino N:NIH(S) Fox1 ^{nu} xenotransplantado con la línea celular de osteosarcoma humano MG-63.....	162
6.11.6 Evaluación de los efectos tóxicos de las metalodrogas.....	162
6.12 Técnicas auxiliares	
6.12.1 Determinación de proteínas.....	162
6.13 Análisis estadístico.....	163
7. Bibliografía.....	164
8. Publicaciones.....	190

1. INTRODUCCIÓN

“Si empiezo a desconfiar de mi suerte estoy perdido, pues tengo ideas cada vez menos atrevidas”. Mi genio Amor, Inédito, Patricio Rey y sus redonditos de Ricota.

1.1 Metalofarmacos: usos y aplicaciones

La Química Medicinal es una rama de la ciencia que realiza estudios de diseño racional de nuevos agentes terapéuticos, que tienden a comprender los eventos moleculares relacionados con la actividad de los mismos. En el marco de un trabajo interdisciplinario, la investigación realizada en este campo ha conducido al desarrollo de un considerable número de compuestos metálicos conocidos como Metalofármacos, con actividades farmacológicas variadas. Entre ellos cabe mencionar al cisplatino (*cis*-Pt) y nuevos compuestos relacionados (como el carboplatino), la auranofina (compuesto de oro), el carbonato de litio, y otros (Orvig y Abraham. 1999). Muchos científicos actualmente dirigen su atención a la obtención de nuevos compuestos de diversos metales con propiedades antitumorales. En particular, son de gran interés compuestos de metales de transición con los que, por ejemplo, se pretende obtener compuestos más ventajosos que el *cis*-Pt entre otros. Estos estudios se basan en la versatilidad que presentan los nuevos compuestos por la presencia de sitios de coordinación adicionales, diferentes afinidades del ligando por el metal, diferentes estados de oxidación del metal, etc (Clark y col. 1999, Malina y col. 2001). Varios procedimientos terapéuticos actualmente en uso para el tratamiento de tumores no son totalmente efectivos, o causan importantes efectos adversos. Es por esto que es de gran interés desarrollar nuevos compuestos que sean aptos para el tratamiento de los pacientes sin marcados efectos colaterales. En varios casos se ha observado que cuando el ligando presenta actividad farmacológica propia, mediante la complejación a un metal se logra un incremento de su actividad. Por lo cual se trata de lograr así un aumento de la actividad biológica y/o farmacológica mediante la coordinación o complejación. Esta actividad adquirida está fuertemente relacionada con la estructura del complejo formado y por consiguiente con sus propiedades fisicoquímicas, lo que consecuentemente afectará sus propiedades biológicas (Giovagnini y col. 2008).

Los compuestos propuestos en esta tesis comprenden un grupo de compuestos netamente inorgánicos como son los polioxometalatos y derivados de platino y vanadio coordinados con diversos compuestos orgánicos.

1.2 Ligandos

1.2.1 Flavonoides

1.2.1.1 Crisina

La crisina (5,7-dihydroxiflavona) es un flavonoide natural que se encuentra presente en extractos de plantas, en la miel y el propóleo (Figura 1A). Sus principales actividades biológicas involucran efectos antiinflamatorios, anticancerígenos y principalmente antioxidativos.

Se ha reportado que la crisina inhibe la proliferación de células tumorales humanas como las Hela y KB y murinas como las LM3 y B16-F0, con valores de IC₅₀ que no superan los 20 μM (Cárdenas y col. 2006).

También se han reportado múltiples trabajos que demuestran potenciales aplicaciones clínicas y terapéuticas contra enfermedades que impliquen procesos inflamatorios como alteraciones vasculares (Darwish y col. 2014, El-Bassossy y col. 2014).

1.2.1.2 Silibinina

La silibinina (Fig 1B) es el mayor y más activo flavolignano presente en la silimarina, que se extrae de flores y hojas de *Sylibum marianum* (Cardo de Santa María).

La silibinina es ampliamente utilizada en terapias para el mejoramiento de la función hepática y como protector frente a una serie de hepatotoxinas como la CCl₄, galactosamina, faloidina, etc, (Gazak y col. 2004). Este ligando posee también una destacada actividad como antioxidante con una marcada capacidad para secuestrar radicales libres (Gharagozloo y col. 2008).

Por otro lado, diversos estudios *in vitro* e *in vivo* revelaron la capacidad del ligando de actuar contra el cáncer incluyendo efectos antiproliferativos con un incremento de la apoptosis, inhibición del crecimiento y arresto del ciclo celular en células tumorales de pulmón, páncreas, entre otras (Ting y col. 2013, Mateen y col. 2013).

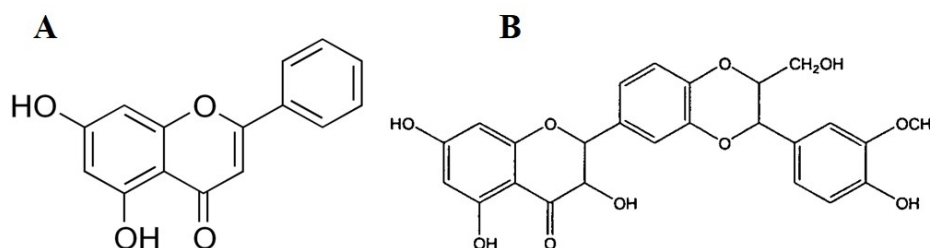


Figura 1 Estructuras de los flavonoides crisina (A) y silibinina (B).

1.2.2 Hidroxiquinolinas

Un grupo de ligandos interesantes por su variada actividad biológica son las hidroxiquinolinas y sus derivados (figura 2).

Estos compuestos presentan una gran versatilidad en sus propiedades de coordinación con metales, lo cual determina entre otras cosas su aplicación y uso en química analítica y procesos de separación de metales (Prachayasittikul y col. 2013). Esta familia de compuestos resulta muy interesante debido al avanzado estado de pruebas clínicas para su uso en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer y Huntington (Faux y col. 2010). Además, dentro de su espectro de actividades biológicas poseen actividad bacteriostática, fungicida y antitumoral. Con respecto a esta última propiedad cabe destacar que diversos reportes han demostrado el potencial poder antitumoral de la hidroxiquinolina y sus derivados tanto en sistemas *in vitro* como *in vivo*. Diversos reportes indican que este tipo de ligandos generaron altos niveles de citotoxicidad en diversas líneas celulares tumorales de origen humano derivadas de mama, páncreas, ovario y linfomas, entre otras. En concordancia, estudios *in vivo* realizados con ratones *nude* xenotransplantados con células tumorales de ovario y de linfoma B en presencia de clioquinol demuestran su efecto antiproliferativo ya que al cabo de 20 días de tratamiento se observa una remisión completa de ambos tipos de tumores. Estudios bioquímicos revelaron que el clioquinol causa la muerte de las células tumorales teniendo como principal mecanismo de muerte la inducción de la apoptosis dependiente de caspasas (Ding y col. 2005).

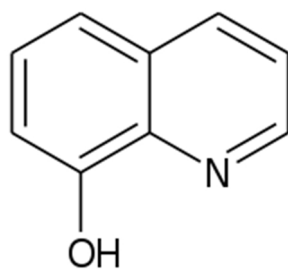


Figura 2 Estructura de la 8-hidroxiquinolina

1.2.3 Ligandos donores de oxígeno

En sistemas biológicos, ligandos que son agentes quelantes fuertes son muy importantes en medio acuoso debido a que ofrecen la posibilidad de atrapar diferentes especies metálicas del medio (Harding y Mokdsi 2000). La quelación es particularmente importante en procesos donde diferentes metales son adquiridos, transportados y almacenados por compuestos de bajo peso molecular que poseen grupos funcionales con múltiples oxígenos donores tales como carboxilatos, hidroxamatos y catecolatos (Costas y col. 2004).

Entre estos ligandos se encuentra la hidroxilamina H_2NOH que es capaz de unirse a diferentes metales y además existen diferentes reportes bibliográficos de síntesis y caracterización de complejos conteniendo al ligando hidroxilamido NH_2O^- (Crans, 1998).

En la familia de compuestos con múltiples grupos donores de oxígeno, el oxodiacetato, $O(CH_2COO^-)_2$, (oda) es un agente complejante muy versátil, ya que presenta sus grupos donores de oxígeno en diferentes orientaciones, permitiendo la construcción de redes diversas. Como ligando, oda posee un conjunto OOO donador que le permite complejar iones metálicos formando anillos quelatos que le confieren una estabilidad mucho mayor (Baggio y col. 2003).

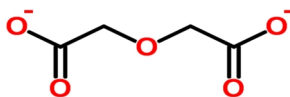


Figura 3 Estructura del oxodiacetato

1.2.4 Ligandos heterocíclicos

Este tipo de ligandos comprende una familia de heterociclos nitrogenados como imidazoles, bipyridinas, fenantrolinas y bases puricas, entre otros. Entre las actividades farmacológicas que poseen este tipo de ligandos se encuentra la posibilidad de intercalarse en la hebra de ADN generando una distorsión y clivaje de la misma. Es por esto que en los últimos años se ha incrementado el uso de este tipo de moléculas como ligandos de distintos metales para formar metalocompuestos con fines terapéuticos frente a enfermedades como el cáncer (Zhao y Lin 2005, Liu y Gust 2013).

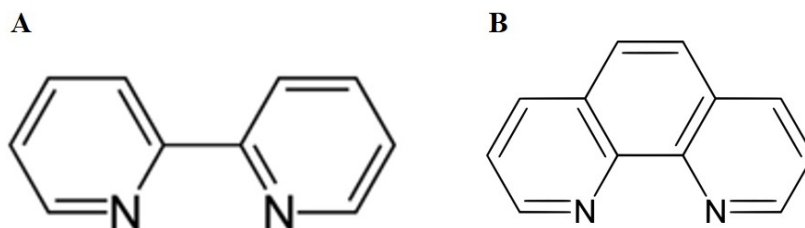


Figura 4 Estructuras de la 2,2 bipyridina (A) y de la 1,10 fenantrolina (B)

1.3 Polioxometalatos: generalidades.

Dentro de los materiales más interesantes y de mayor potencial, se encuentra un extenso grupo de compuestos inorgánicos denominados “polioxometalatos”. Si bien dichos sistemas oxídicos condensados se conocen desde fines del siglo XIX, no fue hasta fines del siglo XX, que comenzaron a revalorizarse, dadas sus atractivas propiedades químicas y su versatilidad estructural. Estas propiedades tales como la polaridad, potencial redox, distribución superficial de cargas, estructura y estabilidad en condiciones fisiológicas, los convierten en especies funcionales a exigencias medioambientales y económicas, ya que tienen grandes posibilidades de aplicación en diferentes áreas como la biomedicina, en tecnología de materiales y tecnología alimentaria.

Los polioxometalatos (POMs) son clusters de aniones oxídicos de metales de transición, usualmente especies d^0 (V(V), Nb (V), Ta (V), Mo(VI) y W (VI)) formados por un proceso de autoensamblaje. Los heteropolioxometalatos (HPOMs) contienen además uno o más heteroátomos con electrones de valencia p-, d- y f- (Ej: P, Si, Ge, As, etc.).

Los iso y heteropolioxometalatos, están predominantemente formados por octaedros MO_6 con enlaces terminales cortos $M=O$ que tienden a formar estructuras discretas y compactas en las que dichos enlaces, se muestran más expuestos y por consiguiente presentan mayor reactividad. La estructura de los mismos se puede interpretar como fragmentos discretos de óxidos metálicos de diferente forma y tamaño (Figura 5).

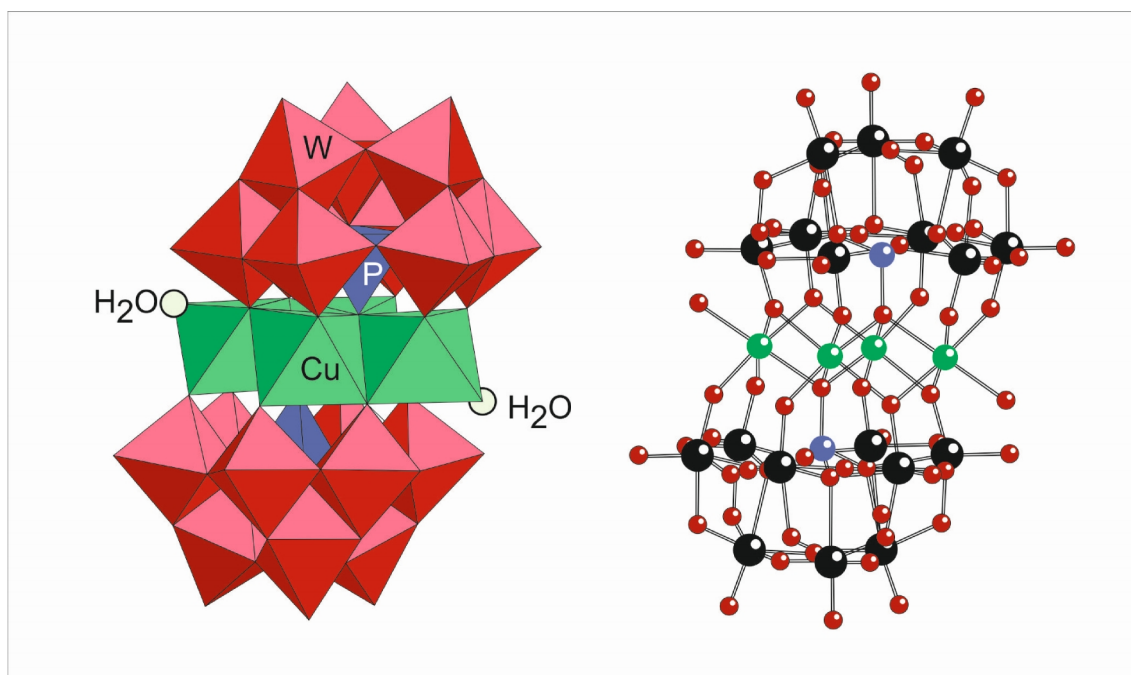


Figura 5 Estructura de $K_{10}[M_4(H_2O)_2(PW_9O_{34})_2] \cdot 20H_2O$ con M: Co(II), Mn(II), Zn(II) y Cu(II). Adaptado de tesis doctoral M.G. Egusquiza, 2009

Dentro de este contexto, en este trabajo de Tesis doctoral se presenta el estudio sobre la actividad biológica de una serie de heteropolitungstos complejos de fórmula general $K_{10}[M_4(H_2O)_2(PW_9O_{34})_2] \cdot 20 H_2O$ con $M = Co(II), Zn(II), Cu(II)$ y $Mn(II)$. Dado que el metal M puede ser un metal de transición de diferentes propiedades químicas y potencial redox, resultó interesante profundizar el estudio del compuesto de cobre que fue el que evidenció mayor actividad antitumoral en una serie de estos compuestos estudiados en cultivos celulares.

1.3.1. Aplicaciones bioquímicas y farmacológicas

1.3.1.1 Aplicaciones analíticas

Los polioxometalatos han sido utilizados durante mucho tiempo para la detección, separación y cuantificación de diversos tipos de especies químicas y biológicas. Este tipo de actividad esta fundamentada en algunas de las propiedades de estos compuestos como son su actividad electroquímica, su reducibilidad y sus altos pesos moleculares, que facilitan la formación de especies coloreadas y la variedad de elementos que pueden incorporarse a las estructuras básicas de los mismos (Pope y Müller, 1991) Así, por ejemplo, los ácidos "fosfotúngsticos" han sido frecuentemente utilizados como agentes precipitantes de alcaloides, proteínas, y purinas (Pope, 1983). Asimismo, existen técnicas que muestran que 26 elementos diferentes pueden determinarse a través de la formación de heteropolimolibdatos de distinto tipo (Parker, 1983).

Además, algunos politungstos son utilizados como agentes de contraste para el estudio de material biológico por microscopía electrónica (Pope, 1983). Por otra parte, la combinación de este tipo de reacciones con técnicas analíticas como la voltametría cíclica o los métodos cromatográficos, han ampliado y potenciado enormemente la utilización de este tipo de sistemas en el análisis químico (Pope y Müller, 1991).

1.3.1.2 Actividad farmacológica

Varias sales de polioxometalatos han demostrado poseer actividad biológica relevante que incluye, actividad antitumoral, antiviral y antiretroviral, desbancándose este ultima en terapias relacionadas con el SIDA.

1.3.1.2.1 Utilización de molibdatos y tungstos como citostáticos.

Tomando como idea principal que las células tumorales poseen en general un pH más ácido que las normales, se sugirió la idea de que en medios ácidos se podía generar una polimerización de MoO_4^{-2} y WO_4^{-2} que finalmente condujera a la formación de fósforo-heteropolimetalatos, con el fin de interferir el metabolismo del fósforo en las células cancerosas y así inhibir el crecimiento de las mismas. Los resultados indicaron que el efecto es claramente dependiente del pH y que .no necesariamente debe admitirse sólo una interacción de los polioxometalatos con el fosfato sino que también son factibles interacciones con otros fragmentos celulares (Schonfeld y Glemser, 1975).

1.3.1.2.2 Utilización de polioxometalatos en los tratamientos del SIDA.

Diversos estudios demostraron la acción antiviral *in vitro* del 12-silicotungstato, $[\text{SiW}_{12}\text{O}_{40}]^{-4}$ testado frente a diversos sistemas virales (Jasmin y col. 1973, Haapala y col. 1973, Raybaud y col. 1972), aunque no pudieron detectar ese tipo de actividad *in vivo*. Sin embargo, estos mismos autores demostraron una potente acción antiviral y antitumoral del polioxanión $[\text{NaSb}_9\text{W}_{21}\text{O}_{86}]^{-18}$ tanto *in vitro* como *in vivo* (Jasmin y col. 1974). Posteriormente, ensayos clínicos han mostrado que la misma especie $[\text{NaSb}_9\text{W}_{21}\text{O}_{86}]^{-18}$ denominada corrientemente "HPA-23", aparece como un fármaco altamente promisorio en el tratamiento de enfermos de SIDA, los cuales requieren de una aplicación en dosis de 200 mg disueltos en 250 ml de solución isotónica glucosada, por infusión lenta presentando bajo esa forma muy bajo nivel de toxicidad (Rozenbaum y col. 1985). Las razones de su marcada actividad biológica no están totalmente dilucidadas, siendo un probable mecanismo propuesto la inhibición de la fijación del HIV sobre su receptor celular, es decir, el bloqueo de los receptores CD4 de la membrana plasmática para su interacción con la llamada glicoproteína gp120 de la envoltura viral (Hill y col. 1989), ya que es conocido que esta droga tiene un escaso efecto sobre la replicación del HIV *in vitro* (Inouye y col. 1990). Por otro lado, se sabe que diversos polianiones, tales como el sulfato de dextrano, de manano o el polisulfato de pentosano, ejercen un efecto de este tipo, por lo que no sería de extrañar que también el "HPA-23" con su elevada carga y tal vez también por efecto de su tamaño pudiera actuar de modo similar (Habich 1991).

1.3.1.2.3 Utilización de polioxometalatos como antitumorales.

La importancia biomédica de los polioxometalatos como antitumorales fue reportada por Yamase y col. los cuales demostraron que el anión $\text{Mo}_7\text{O}_{24}^{-6}$ en forma de trihidrato de su sal de isopropilamonio, tenía una potente actividad antitumoral (Yamase y col. 1988).

La inhibición de crecimiento tumoral causada por este compuesto es superior a la producida por drogas de eficacia comprobada como 5-fluorouracilo. Estos autores sugieren que la actividad de este polioxometalato se debería a un proceso redox cíclico con conocida fotorreducción del heptamolibdato (Yamase y col. 1981).

Experiencias realizadas con la especie fotorreducida, muestran que la misma es fuertemente citotóxica (Yamase y col. 1988) lo que sugiere que el efecto antitumoral se debería a la acción de la especie reducida generada continuamente a través del ciclo redox arriba mencionado.

Recientes avances demuestran efectos antitumorales prometedores tanto *in vitro* como *in vivo* de diversos poliooxomolibdatos contra células tumorales de origen pancreático y gástrico (Dianat y col. 2013, Ogata y col. 2005, Ogata y col. 2008).

1.4 Platino: Historia y generalidades

Los metales durante muchos años fueron de interés en el área del cáncer por su potencial acción carcinogénica antes que por sus posibles efectos terapéuticos antitumorales. Este panorama cambió drásticamente cuando en 1969, Roserberg y col. demostraron la potencial actividad antitumoral de complejos de coordinación de platino (Rosenberg y col. 1969). Esta actividad tan importante surgió de un experimento diseñado para estudiar el efecto de campos eléctricos oscilatorios sobre el crecimiento de bacterias, en el cual Rosenberg y col. suspendieron un cultivo de *Escherichia coli* en una solución de NH_4Cl entre dos electrodos de platino y comprobaron que este proceso inhibía la división celular

pero no el crecimiento (Rosenberg y col. 1965). En este estudio se identificó a la especie $[\text{PtCl}_6]^{-2}$ presente fundamentalmente como la sal de amonio $(\text{NH}_4)_2\text{PtCl}_6$ la cual después de 2 ó 3 días de envejecimiento, período en el que ocurren reacciones fotoquímicas, generaba la especie *cis*- $[\text{PtCl}_4(\text{NH}_3)_2]$. Estudios realizados con ambos isómeros geométricos (*cis* y *trans*) sintetizados demostraron que sólo el isómero *cis* era biológicamente activo. El mismo efecto fue observado en estudios con complejos similares de Pt(II). La propiedad de estos isómeros *cis* de inhibir la división pero no el crecimiento celular, sugirió que estos compuestos podrían tener propiedades antitumorales.

Los primeros estudios sobre las propiedades antitumorales de estas drogas se realizaron sobre animales de experimentación y demostraron poseer un elevado efecto inhibitorio de tumores en esas experiencias. De estas primeras drogas investigadas, el *cis*- $[\text{Pt}(\text{NH}_4)_2\text{Cl}_2]$ mostró ser la más potente y poseer el más amplio espectro de actividad antitumoral, lo cual determinó que este complejo fuese sometido a extensos estudios clínicos, toxicológicos y farmacológicos.

1.4.1 Ensayos clínicos del *cis*- $[\text{Pt}(\text{NH}_4)_2\text{Cl}_2]$

El comienzo de los ensayos clínicos con esta droga tuvo lugar en Estados Unidos con el auspicio del Instituto Nacional del Cáncer (*NCI*). Estos estudios evidenciaron que el complejo presenta una significativa actividad frente a diferentes tipos de tumores como carcinomas cervicales, melanoma, osteosarcoma, neuroblastomas, pero particularmente para aquellos localizados en la región genital-urinaria, como son el cáncer de testículos y de ovario (Cleare M.J. y Hydes P.C 1980).

A partir de 1978 la droga comenzó a comercializarse en los Estados Unidos bajo el nombre de *Platinol* y en 1979 en Gran Bretaña bajo el nombre comercial de *Neoplatin* para utilización en el tratamiento de cánceres de testículo y ovario (Wiltshaw. 1979).

Los estudios clínicos y farmacocinéticos demostraron una alta retención del metal en el hígado, el riñón y el intestino, y la vía urinaria como la principal vía de excreción. La mayor parte de los eventos tóxicos de las drogas derivadas de platino ocurren a nivel del riñón. Además, otro tipo de manifestaciones tóxicas secundarias observadas con el uso de estas drogas son las náuseas y los vómitos así como la pérdida gradual del sentido auditivo.

1.4.2 Uso de drogas de platino como potenciadores de Radioterapia

Las terapias utilizando radiación han sido ampliamente empleadas para el tratamiento de diversos tumores (Rosenberg y col. 1980). Este tipo de terapias tienen una efectividad limitada sobre ciertas partes del tumor que presentan déficit de oxígeno (células hipóxicas) presentes en la mayoría de los tumores, generando radioresistencia (Drouple 1988). Es por esto que un aspecto importante en la búsqueda de rutas capaces de superar esa radioresistencia incluye el uso de agentes oxidantes de naturaleza química que actúen como radiosensibilizadores de aquellas células hipóxicas sin alterar la condición y el *status* de las células oxigenadas. Se espera que estos complejos puedan penetrar en la región de células tumorales hipóxicas con más facilidad que el O_2 y así facilitar la interacción con la radiación correspondiente (Drouple 1985). En ese camino, Richmond y Powers encontraron que el *cis*-Pt era un eficiente agente radiosensibilizante, abriendo e iniciando una serie de estudios y análisis de diversos compuestos derivados de platino (Richmond. y Powers, 1976).

Los mecanismos de acción sugeridos indican que el complejo químico actúa en parte a través de mecanismos de radicales libres y en parte por intermediarios reactivos generados también por la radiación.

Los primeros estudios realizados sugirieron que la aplicación conjunta de radiación combinada con compuestos de platino puede mejorar el tratamiento de ciertos tumores como cánceres de cuello, cerebro y vejiga y de varios melanomas (Drouple 1985, Drouple 1988).

En la actualidad, diversos reportes indican que la combinación de complejos de platino con radioterapia mejora la efectividad terapéutica en varios tipos de tumores generando una mayor supervivencia sin causar efectos secundarios posteriores (Vale y col. 2010, Moreno-Jiménez y Aristu 2007, Ghosh-Laskar y col. 2014).

1.4.3 Compuestos de platino de segunda generación: Ensayos clínicos y estado actual.

La alta actividad del *cis*-Pt contra tumores urogenitales, carcinomas cervicales y otros tipos de tumores impulsó el estudio y el desarrollo de fármacos de nueva generación basados en platino como han sido el carboplatino, nedaplatino y el oxaliplatino (Figura 6) durante las décadas de 1970 y 1980 con el fin de potenciar los efectos antitumorales del *cis*-Pt y mejorar su solubilidad, pero tratando de evitar sus efectos secundarios y su resistencia en ciertos tipos de tumores (Weiss y col. 1984, Calvert y col. 1984).

Los ensayos clínicos realizados con estos complejos de segunda generación estuvieron caracterizados por la observación de una mayor mielotoxicidad y una reducida neurotoxicidad, lo cual los hizo muy efectivos en tratamientos antineoplásicos, mejorando las propiedades del *cis*-Pt (Weiss y col. 1984, Calvert y col. 1984).

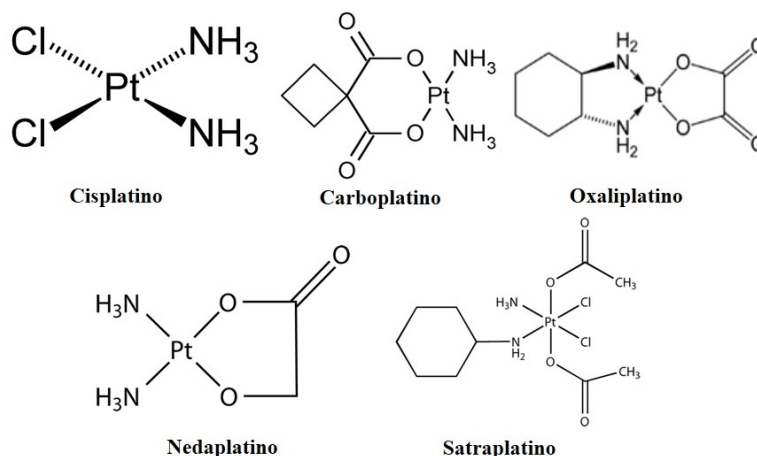


Figura 6 Estructuras de diversos complejos de platino con actividad antitumoral

Además, la búsqueda de mejoras en las propiedades citotóxicas de compuestos de platino análogos al *cis*-Pt ha llevado a estudiar una amplia variedad de nuevos complejos con interesantes propiedades clínicas como el satraplatino el cual puede ser administrado oralmente. (Kelland y col. 1993, Choy y col. 2008).

Esto llevó a que más de 40 complejos de platino de diversa naturaleza lleguen a ser evaluados hasta fase experimental III (Gomez-Ruiz 2010).

Con todas las investigaciones realizadas con el paso de los años se ha observado que los complejos de platino tienen un buen índice de efectividad frente el cáncer, aunque el gran problema asociado a su uso es el alto número de efectos secundarios que presentan y su

inactividad contra determinados tipos de tumores.(Jakupec y col. 2003, Galanski y col. 2003, Galanski 2006) Además, estos fármacos tienden a generar resistencia en ciertos tipos de tumores, siendo éste uno de los fenómenos responsables de la mortalidad en pacientes con cáncer. Sin embargo, se ha observado que algunos compuestos del tipo *trans*-platino constituyen una alternativa muy interesante a los compuestos del tipo *cis*-Pt, ya que muestran una elevada actividad sobre células cancerosas resistentes. (Aris y Farrell. 2009, Kalinowska-Lis y col. 2008).

Dentro de los más estudiados se encuentran aquellos compuestos mono- y polinucleares que contienen ligandos con heterociclos, aminas alifáticas, fosfinas, etc.

Actualmente, se está apuntando a dos vías principales dentro de la investigación en esta área que son: la síntesis de complejos de platino con ligandos que puedan aumentar la selectividad hacia los distintos tumores tratados,(Stathopoulos y col. 2005, Stathopoulos y col. 2006, Boulikas y col. 2005) y el desarrollo de las propiedades antitumorales de complejos de platino no clásicos.(Heringova y col. 2006, Boccarelli y col. 2006, Guddneppanavar y Bierbach, 2007).

1.4.4 Mecanismos de acción

A pesar de los enormes esfuerzos que se han realizado durante los últimos años, aún no se conocen con exactitud los detalles de los mecanismos de acción antineoplásicos de este tipo de complejos de platino. Existe un consenso de la comunidad científica en aceptar que la molécula de ADN es el blanco biológico de este tipo de fármacos, debido a que en biopsias realizadas sobre tumores de pacientes tratados con compuestos de platino, se ha observado “ADN platinado”, es decir, con altas concentraciones de este metal (Takahara y col. 1996, Klein y Hambley. 2009).

Muchos experimentos recientes han arrojado nuevos indicios sobre el posible mecanismo de acción de los compuestos de platino, indicando gran especificidad de los mismos para enlazarse con el N7 de las guaninas del ADN, generando una torsión sobre la doble hélice e impidiendo de esa manera la replicación del mismo. Además, los complejos de platino pueden enlazarse a distintas proteínas de transporte como la albúmina y la transferrina, llevando estas drogas hasta el interior de la célula. Una vez dentro de la célula la especie activa, para compuestos como el *cis*-Pt, es la resultante de la hidrólisis de alguno de los enlaces Pt-Cl de los complejos, debido a la menor concentración de iones Cl⁻ en el citoplasma que en el medio extracelular. Estos reaccionan con diferentes moléculas como grupos tioles, metalotioneínas y ADN (Klein y Hambley. 2009).

Aunque a grandes rasgos éste parece ser el mecanismo de acción que siguen los compuestos del tipo *cis*-Pt, durante las últimas cuatro décadas se han hecho numerosos esfuerzos para la síntesis de complejos de platino de nueva generación que puedan llevar a la obtención de avances más concretos en la dilucidación del mecanismo de acción celular de los mismos. (Klein y Hambley. 2009, Jakupec y col. 2003, Galansky y col. 2005).

1.5 Vanadio: Descubrimiento y generalidades

El vanadio es un elemento del grupo V de los metales de transición de la tabla periódica. Fue descubierto por el químico español Andres M. Del Río en México en el año 1801, quien le dio el nombre de erytronium, debido al color rojo intenso que presentaban los minerales que contenían vanadio. Sin embargo, este elemento debe su denominación actual al suizo Nils G. Sefström quien lo redescubrió en 1830 y lo denominó vanadio en honor a Vanadis, la diosa de la belleza, el misterio y la guerra en la

mitología nórdica (Nriagu 1998). Probablemente sea por esas dos primeras características que haya sido nombrado de tal modo, ya que el vanadio presenta hermosos colores en soluciones acuosas según sea su estado de oxidación que al depender del pH, le confería cualidades misteriosas para esa época (Mukherjee et al 2004).

El vanadio es un elemento traza presente en la corteza terrestre (aproximadamente 0,02%) con una concentración promedio de 150 g/t, similar a la del zinc y más común que el cobre o el níquel (Habashi 2002). La concentración promedio del vanadio en aguas de río, lago y océano es de 10^{-5} g/L (Crans y Tracey 1998). También se encuentra presente en ciertos organismos vivos tales como tunicados (invertebrados marinos), hallándose en altas concentraciones en unas células de estos animales llamadas vanadocitos (Michibata y Sakurai 1990; Michibata y col. 2002). Por otro lado, este metal se encuentra en el sitio activo de enzimas tales como nitrogenasas y haloperoxidasas presentes en bacterias, algas y hongos. (Eady et al 1988; Butler y Walker 1993).

También podemos encontrar al vanadio en algunos alimentos como son los champiñones, mariscos, semillas de eneldo, perejil, pimienta negra, cereales y frutas frescas (Garcia 2006). Si bien en estos organismos al igual que en plantas se considera un metal esencial, su esencialidad en humanos todavía está por establecerse. En general, se acepta que el vanadio es esencial para el normal desarrollo esquelético y el crecimiento de mamíferos, aunque en humanos no hay evidencias de signos de deficiencia que puedan remitirnos a la esencialidad. Sin embargo, en vertebrados superiores hay datos que permiten sugerir para el vanadio, funciones importantes a nivel del tejido óseo (Nielsen 1995).

1.5.1 Entrada, absorción, excreción y almacenamiento del vanadio

Aunque los mecanismos involucrados en la absorción, excreción y almacenamiento del vanadio en sistemas vivos no están totalmente comprendidos, en la Figura 7 se representa esquemáticamente lo que podría ocurrir en animales superiores.

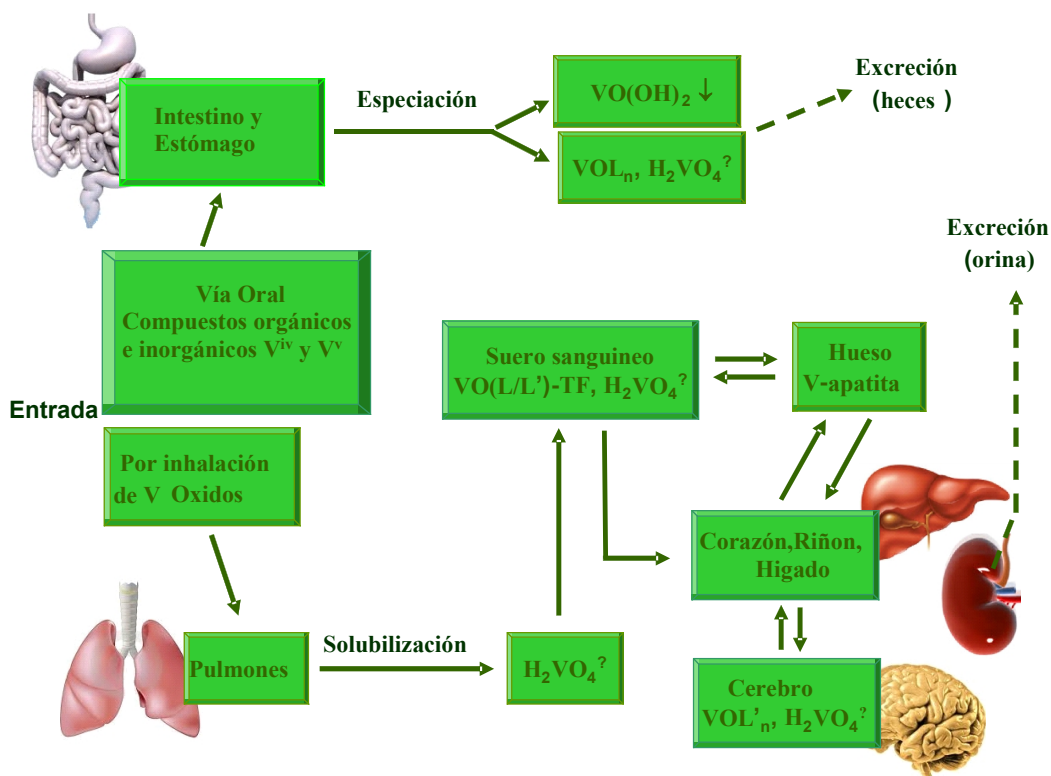


Figura 7 Entrada y distribución del vanadio en el cuerpo (Adaptado de Costa Pessoa 2014)

Las principales fuentes de exposición al vanadio en la población general las constituyen los gases provenientes de la combustión del petróleo, los gases de la metalurgia y la ingesta de alimentos (Mukherjee et al 2004). Una vez que ha ingresado al organismo, el vanadio(V) es transformado en la forma catiónica conocida como vanadilo(IV) en el estómago antes de ser absorbido por el duodeno a través de un mecanismo desconocido. Luego de esto el vanadio es transportado por proteínas como la albúmina y la transferrina a través de la sangre hacia los distintos tejidos. Luego de su ingesta o inhalación, el vanadio se distribuye rápidamente. Inicialmente, existe acumulación en pulmones, riñones, hígado y músculo, pero finalmente, el principal sitio de almacenamiento es el hueso (Upreti 1995; Baran 2000). Luego, el vanadio absorbido es excretado por mecanismos biliares, urinarios y fecales. En particular, en orina el vanadilo se halla complejo con ácido ascórbico (Kramer et al 1995; Mukherjee et al 2004). Las cantidades de vanadio en distintos tejidos corporales oscilan entre 3,5 y 10 ng/g de peso seco. En las células, el vanadio se distribuye tanto en el núcleo como en las fracciones solubles del sobrenadante. En el citosol, el vanadilo se halla unido a diferentes ligandos que contienen grupos fosfato, carboxilo o amino (Evangelou 2002).

Con respecto a las vías de entrada del vanadio a la célula, el mismo en forma de vanadato(V) aniónico (VO_3^-) puede ser absorbido en gran parte (alrededor de cinco veces más que el oxovanadio(IV)) a través del sistema de transporte aniónico (Mukherjee et al 2004).

Una vez en el interior de la célula, el vanadato puede ser reducido a vanadilo(IV) por varios agentes reductores fisiológicos como el glutatión (GSH) y otros constituyentes celulares (Liu et al 1997).

1.5.2 Propiedades químicas y bioquímicas del vanadio

El vanadio presenta diferentes estados de oxidación (desde -1 a + 5) siendo los estados (+3), (+4) y (+5) los más relevantes en sistemas biológicos. El vanadio posee una geometría bien definida de su esfera de coordinación interna con respecto a los estados de oxidación habituales del metal mientras que la esfera externa no está bien delimitada. Por lo tanto, hay una donación de un par de electrones desde diversos ligandos a la esfera interna del metal, otorgándole a la unión un alto grado de carácter covalente. En solución acuosa, el vanadato (+5) y el vanadilo (+4) presentan diferentes reacciones de hidrólisis y condensación. Los productos obtenidos varían con el pH, la concentración de vanadio y ligandos que pueden formar complejos con diferentes geometrías de coordinación. Una característica importante de las soluciones acuosas ácidas de vanadio es que el vanadilo (VO^{2+}) se encuentra en forma de catión, mientras que el vanadato es un anión, excepto a pH inferior a 3 donde está presente como catión pervanadilo, denominado comúnmente como VO_2^+ .

Una de las características más relevantes del vanadato es su similitud con el fosfato en cuanto a carga y estructura. En la Figura 8 se muestran las analogías estructurales.

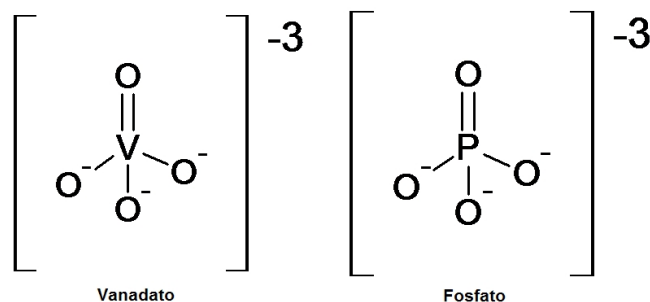


Figura 8 Analogía entre el vanadato y el fosfato

Los ésteres de fosfato son metabolitos celulares comunes e importantes, ya que el grupo fosfato aumenta la solubilidad mientras que la carga aniónica incrementa el reconocimiento entre una enzima y su sustrato. En el ATP, el fosfato almacena una energía de 7 kcal/mol a través de la formación de uniones anhídridas mientras que los ésteres de fosfato almacenan alrededor de 3 Kcal/mol. El fosfato además juega un papel estructural y funcional en moléculas de ADN y ARN.

Esta analogía Fosfato-Vanadato (F-V) ha sido empleada con éxito en enzimas que catalizan reacciones de ésteres de fosfato y fosfato anhídridos. La formación de estos análogos abrió las puertas al estudio funcional y estructural de esta clase de V-compuestos. La analogía entre los V-compuestos pentacoordinados y el estado de transición de la hidrólisis del éster fosfato explica por qué diversos compuestos de vanadio son potentes inhibidores de ribonucleasas, fosfatasas, ATPasas y otras fosforilasas.

1.5.2.1 Química del vanadio(IV) en solución

La especie mejor conocida del V(IV) en solución acuosa es el catión vanadilo (catión VO^{2+} , $[VO(H_2O)_5]^{2+}$) (Figura 9) (Baes y col. 1976; Chasteen 1983; Vilas Boas y col. 1987). El catión vanadilo es estable a pH ácido siendo la principal especie a pH 3. El mismo se distingue por poseer 8 líneas en el espectro de resonancia paramagnética electrónica (EPR) a temperatura ambiente. Cuando se incrementa el pH a ~ 4 , un protón empieza a perderse (pK_a entre 5,0 a 6 y comienza la formación de especies hidrolizadas $[VO(H_2O)_4(OH)]^+$. En el esquema 10 se muestra la especiación simple que existe a concentraciones nano-micromolares del V(IV) mientras que en el esquema 11 se puede observar la especiación obtenida a concentraciones milimolares.

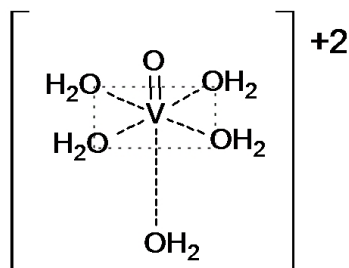


Figura 9 Estructura del catión vanadilo en solución

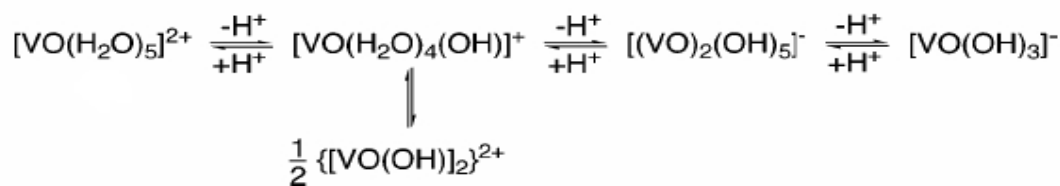


Figura 10 Productos de hidrólisis de $[\text{VO}(\text{H}_2\text{O})_5]^{2+}$ a concentraciones nano-micromolares. Tomado de Crans y col. 2004

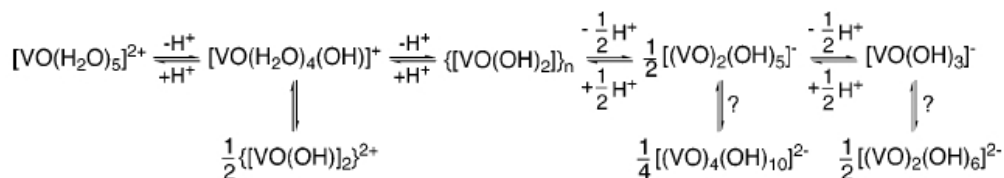


Figura 11 Productos de hidrólisis de $[\text{VO}(\text{H}_2\text{O})_5]^{2+}$ a concentraciones micro-milimolar. Tomado de Crans y col. 2004

A medida que se forma el $[\text{VO}(\text{H}_2\text{O})_4(\text{OH})]^+$, aparece un dímero no detectado por el EPR conocido como monohidroxovanadilo(IV), $[\text{VO}(\text{OH})_2]^{2+}$. Al incrementar el pH de la solución por encima de 5 observamos una abrupta disminución en la intensidad de la señal del EPR debido a la formación de hidróxido de vanadilo $\{[\text{VO}(\text{OH})_2]\}_n$, el cual es insoluble. Si continuamos incrementando el pH (6-8), éste se disuelve para formar un dímero, $[(\text{VO})_2(\text{OH})_5]^-$ y subsecuentemente un monómero $[\text{VO}(\text{OH})_3]^-$ ambos cargados negativamente. Solamente esta última especie ha sido bien caracterizada por EPR y espectropía UV-Vis (Iannuzzi y Rieger 1975), mientras que la formación de $[(\text{VO})_2(\text{OH})_5]^-$ fue deducida por análisis potenciométrico (Komura y col. 1977).

La fórmula $[\text{VO}(\text{OH})_3]^-$ parece implicar una especie tetracoordinada. Sin embargo, los estudios experimentales son consistentes con la especie hexacoordinada. Los métodos empleados no proporcionan información exacta sobre la cantidad de moléculas de agua asociadas al ión metálico en solución. Presumiblemente, dos moléculas de agua están asociadas con el ión $[\text{VO}(\text{OH})_3(\text{H}_2\text{O})_2]^-$. Tal estequiometría podría convertir este anión en el catión oxovanadio(IV) a través de tres pasos de protonación sin cambios en la esfera de coordinación (Crans y col. 2004).

La existencia de tales especies oligoméricas fue sugerida en solución básica y neutra a concentraciones micromolares, pero a pH fisiológico, en un medio de no complejación, no puede observarse ningún espectro de EPR (Lachowicz y col. 1975; Chasteen 1983). Diferentes estudios en sistemas biológicos sobre la complejación de V(IV) con diversos ligandos de bajo peso molecular tales como fosfato (Alberico y Micera 1994; Kiss y col. 1998), oxalato (Buglyó y col. 2000), lactato (Micera y col. 1993), glutatión (Pessoa y col. 2001; Pessoa y col. 2002) NAD, NADP (Micera y col. 1999) y azúcares (Branca y col. 1992; Garribba y col. 2001) apoyaron la especiación descrita más arriba en la cual el $[(\text{VO})_2(\text{OH})_5]^-$ es la especie predominante a pH 7-7,5 y el total de V(IV) en todas las especies estaba en el rango de 1-10 μM .

1.5.2.2 Química del vanadio(V) en solución

El vanadio (V) forma el anión vanadato y sus derivados en solución acuosa. El vanadato ha sido reconocido como un análogo estructural y electrónico del fosfato con reacciones de protonación similares (Chasteen 1983; Crans y Tracey 1998; Rehder 1999). La similitud observada en los valores de pK_a para el vanadato (3,5 ; 7,8 ; 12,5) con los del fosfato (2,1 ; 7,2 ; 12,7) (Chasteen 1990) evidencian la analogía electrónica de estas dos

especies. Sin embargo, existen ciertas diferencias tales como que a pH neutro el vanadato en concentraciones menores a 0,1 mM está presente principalmente como monoanión (H_2VO_4^-) mientras que el fosfato se halla como dianión (HPO_4^{2-}) o la diferencia en la estabilidad entre el H_3PO_4 y el H_3VO_4 , donde éste último muy rara vez ha sido documentado (Crans 2005) presumiblemente reflejando la conversión a VO_2^+ . En este aspecto, la alta estabilidad del VO_2^+ se debe al mayor número de coordinación comparado con H_3VO_4 . En concentraciones mayores a 0,1 mM a pH fisiológico el H_2VO_4^- y HVO_4^{2-} oligomerizan a la forma dimérica, tetramérica y pentamérica (Cruywagen y col. 1996). Estas especies son análogas al pirofosfato, especies oligoméricas y poliméricas del fosfato, y contienen uniones anhídrido. Sin embargo, mientras que los derivados del pirofosfato son estables y cinéticamente inertes, las especies de vanadato experimentan interconversiones en solución (Crans y col. 1991; Crans y col. 2004). Otra diferencia importante es que bajo condiciones fisiológicas, el vanadato puede sufrir química redox mientras que el fosfato no.

1.5.3 Propiedades farmacológicas e importancia terapéutica del vanadio

Los efectos biológicos del vanadio incluyen entre otras, acciones insulino-miméticas (Thompson y col. 1999; Thompson y Orvig 2006; Pillai y col. 2013), osteogénicas (Cortizo y col. 2006; Etcheverry y Barrio 2007), antiparasitarias (Fernández y col. 2013) y antitumorales (Djorjevic 1995; Evangelou 2002; Rehder 2012). Además se han reportado efectos sobre la contracción de los vasos sanguíneos e incremento de la afinidad de la mioglobina y la hemoglobina por el oxígeno (Rehder 1992; Thompson y col. 1993; Poucheret y col. 1998). En la actualidad, el sulfato de vanadilo se emplea como generador de masa muscular (Clarkson y Rawson 1999). Además, el vanadio posee efectos estimulatorios de la proliferación y diferenciación celular; efectos sobre el transporte de glucosa e iones a través de la membrana plasmática; interfiere con el movimiento del calcio ionizado intracelular; modula diferentes enzimas y sistemas enzimáticos (Cortizo y Etcheverry 1998; Morinville et al 1998; Narla et al 2001a, 2001b; Shi et al 1999; Barrio et al 2003). También se ha demostrado que el vanadio estimula la mineralización de huesos y dientes, y promueve la reparación ósea (Sakurai et al 1981, Shechter y Shisheva 1993). Diferentes complejos de vanadio (IV) y (V) estimulan la proliferación y la producción de colágeno en osteoblastos en cultivo (Barrio et al 2003).

Sin embargo, el empleo farmacológico del vanadio empezó hace más de un siglo.

En el siglo XIX se recomendaba el uso del vanadio en humanos para casos de anemia, desnutrición y diabetes (Shechter y Shisheva 1993). A fines del siglo XIX, aparece el primer estudio que muestra la efectividad de las sales de vanadio para el tratamiento de la Diabetes mellitus (Lyonnet y Martin 1899). Con el descubrimiento de la insulina, el empleo de las sales de vanadio con fines terapéuticos fue dejado de lado. Sin embargo, los estudios en plantas y animales continuaron hasta que en las últimas décadas del siglo pasado se renovó el interés en este elemento; particularmente, cuando se demostró que las soluciones de vanadio(V) producían efectos insulino-miméticos en modelos *in vitro* e *in vivo* (Morinville y col. 1998).

Posteriormente al descubrimiento de las propiedades insulino-miméticas del vanadio, surgieron otras que posicionarían definitivamente al vanadio como uno de los metales más interesantes a ser estudiados como potencial agente farmacológico. En 1984, se publicó el primer trabajo sobre las propiedades quimiopreventivas del vanadio *in vivo*. En ese reporte, el cáncer de mama inducido en ratas a través de un carcinogénico era prevenido alimentando a los animales con un suplemento de 25 mg/L de VOSO_4 . La presencia del vanadio reducía tanto el promedio de tumores como el número de

incidencias (Thompson y col. 1984). Desde ese momento, los efectos involucrados con la capacidad antitumoral y quimiopreventiva del vanadio han sido ampliamente estudiados tanto en diferentes tipos de líneas celulares tumorales como en modelos animales (Bishayee y Chatterjee 1995; Bishayee y col. 1997; Bishayee y col. 2000; Evangelou 2002).

Hacia la mitad de 1980, los compuestos de vanadio ocuparon una posición única entre los metalofármacos, tanto por sus potentes efectos farmacológicos como por su compleja química de coordinación (Rubinson 1981; Sakurai y col. 1981; Willsky y col. 1984). En resumen, la manera de cómo este metal puede actuar y funcionar en la biosfera incluye estudios sobre su química redox y de coordinación así como aspectos estructurales y funcionales en sistemas biológicos.

1.5.4 Importancia de la complejación del vanadio

La coordinación de especies inorgánicas de vanadio con diversos ligandos tiende a lograr una mejora en la solubilidad, fundamentalmente para el catión vanadilo(IV) que posee una baja solubilidad bajo condiciones fisiológicas. Además, la complejación permitiría aumentar la estabilidad y absorción del vanadio, modificando así sus efectos biológicos y/o farmacológicos, lo cual tendría implicancia en el uso de dosis de concentraciones menores pero más efectivas para el tratamiento de diversas enfermedades. (Yuen y colaboradores 1993; McNeill y colaboradores 1995, Thompson 1999).

1.5.5 Efectos biológicos del vanadio sobre células en cultivo

Diferentes estudios *in vitro* con células en cultivo se llevaron a cabo para estudiar, evaluar y conocer los efectos biológicos del vanadio. A través de estos estudios se encontró que el vanadio estimula la fosforilación de proteínas en residuos de tirosina, aumenta los niveles de fosfoinosítidos, estimula la proliferación de diferentes líneas celulares e incrementa la captación de pequeñas moléculas e iones, entre otros efectos insulino-miméticos. También, se han descrito numerosos reportes que mostraron los efectos citotóxicos, antitumorales, y transformantes en diferentes líneas celulares.

1.5.5.1 Efectos insulino-miméticos. Mecanismos de acción

Las sales de vanadio y sus derivados pueden estimular la captación de glucosa, la síntesis de glucógeno y de lípidos en tejido muscular, adiposo y hepático (Mehdi y Srivastava 2005, Shukla y Bhonde 2008), así como inhibir la gluconeogénesis en el hígado y riñón (Reul y col. 1999; Mosseri y col. 2000; Marzban y col. 2002). También se ha demostrado que inhiben la lipólisis (Shisheva y Shechter 1992; Thompson y Orvig 2006) en células adiposas. Estos efectos, comunes con los que posee la insulina, son reproducidos en su mayoría por las sales de vanadio y sus derivados. A nivel celular, el vanadio activa elementos claves de la vía de señalización de la insulina (Figura 12): como son: la fosforilación del sustrato 1 del receptor de insulina (IRS-1) (Pandey y col. 1998) y activación de vías de transducción de señales intracelulares tales como la vía de las quinasas reguladas extracelularmente (ERK-1/2) (Pandey y col. 1999; Molero y col. 2002), la vía de la quinasa del inositol trifosfato (PI3-K) (Pandey y col. 1998; Molero y col. 1998) y la vía de la quinasa B (PKB) (Li y col. 1997; Pandey y col. 1999). Otro mecanismo utilizado por el vanadio para estimular el metabolismo de la glucosa es la inhibición de las enzimas que estimulan la síntesis de glucógeno como la

fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PEPCK), la glucosa-6-fosfatasa (G6pasa) y la fructosa-6-fosfatasa (Pandey y col. 1998; Sekar y col. 1999; Mosseri y col. 2000; Marzban y col. 2002).

Las acciones del vanadato no dependen del receptor de insulina y otra tirosina quinasa estaría participando de las acciones insulinomiméticas del mismo. Esto fue claramente demostrado con quercetina (IC_{50} 1-2 μ M), un flavonoide natural usado como inhibidor de la fosforilación de sustratos por el receptor en adipocitos (Shisheva, y Shechter 1992). Otros estudios utilizando inhibidores específicos como la wortmanina establecieron que la acción antilipolítica del vanadato era independiente de la activación de la PI3-K y que podría intervenir en un sitio muy distal de la cascada lipolítica (Li y col. 1997).

Aunque estas observaciones podrían no reflejar lo que sucede *in vivo*, estudios adicionales indicarían que el vanadio(IV) y el V(V) son insulinomiméticos activos, pero operan por vías diferentes (Shechter y col. 2003). El vanadilo sería activo a nivel de membrana plasmática y sería el responsable de la captación de glucosa y posiblemente de la inhibición de la lipólisis mientras que el vanadato operaría exclusivamente en el compartimiento citosólico potenciando el metabolismo de la glucosa y de los lípidos (Shechter y col. 2003).

Para el caso de los peroxovanadatos el principal mecanismo de acción es la inhibición potente e irreversible de PTPasas (Morenville y col. 1998). Para los demás complejos, como el bismaltolato oxovanadio(IV) (BMOV) los mecanismos de acción no están claramente establecidos (Peters y col. 2003).

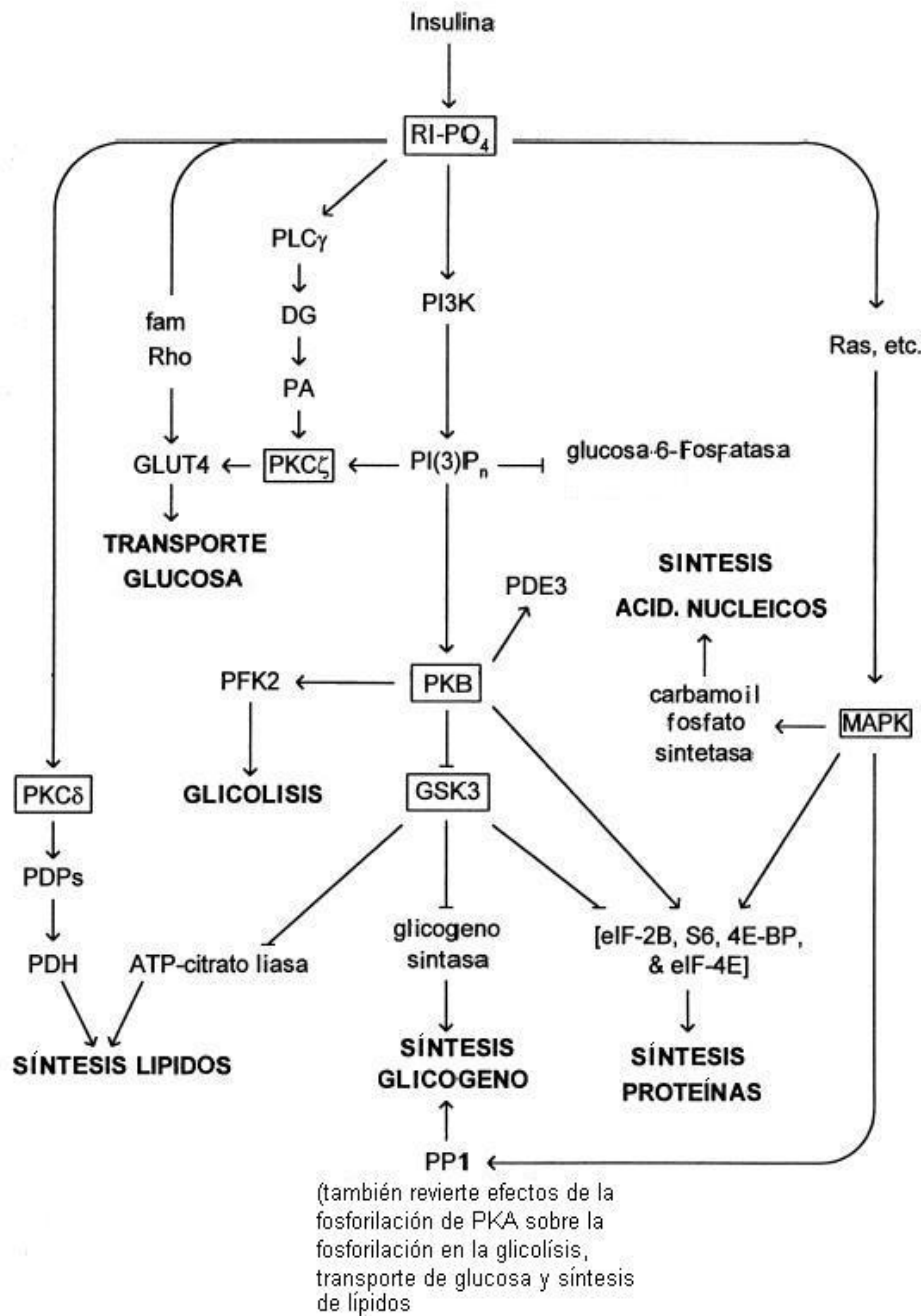


Figura 12 Vía de señalización de la insulina. Modificado de Bolander (2004)

1.5.5.2 Efectos antitumorales del vanadio

El tratamiento antitumoral por cualquier metalofármaco debería cumplir ciertos requisitos y ejercer los siguientes efectos selectivos en células malignas: (a) inhibición de la proliferación, (b) acciones citotóxicas y/o citostáticas (c) reducción y/o inhibición del potencial invasivo o metastásico de las células y (d) reducción o ausencia del potencial para inducir resistencia celular al metalofármaco. Los complejos de vanadio abarcan todas estas propiedades y las ejercen de forma independiente o concertada mediante diversos mecanismos celulares (Figura 13).

Diversos compuestos de vanadio ejercen efectos antitumorales en una variedad de líneas celulares en cultivo (English y col. 1983; Djordjevitcz y Wampler 1985; Zick y Sager-

Eisenberg 1990; Bergamashi y col. 1993; Cortizo y col. 1994; Djordjevic y col. 1995; Kresja y col. 1997; Cortizo y col. 2000; Fu y col. 2008; Rivadeneira y col 2009, 2010, Naso y col 2011).

Se ha señalado que el vanadilo(IV) juega un papel fundamental en la actividad antitumoral de sus complejos y que esa actividad citotóxica estaría influenciada por la estructura de los complejos formados, dejando en evidencia que la potencia citotóxica de los complejos depende del centro activo de vanadilo así como también de la estructura de los complejos (Narla et al 2000; Gosh et al 2000). También se sabe que las células tumorales poseen propiedades diferentes de las células normales. Dentro de esas diferencias se encuentra que éstas poseen menor pH intracelular, niveles de enzimas antioxidantes alterados y, en consecuencia una producción continua de peróxido de hidrógeno; estado redox diferente y mayor contenido de agua (Evangelou 2002). Es probable que ese menor pH intracelular sea la propiedad que le permite a las células tumorales captar mayores cantidades de vanadio, confiriéndole cierta especificidad en la terapéutica antineoplásica ya que resulta esperable que los compuestos de vanadio tengan mayor citotoxicidad en células tumorales que en las normales (Djordjevic 1995; Evangelou et al 1997).

La generación de estrés oxidativo, el arresto del ciclo celular, y la apoptosis son mecanismos que subyacen a la mayoría de los efectos antitumorales que se observan para el vanadio y otros metales con actividad biológica. Es por eso que para comprender los efectos antitumorales de estos compuestos debemos antes describir en detalle el papel de los mismos a nivel celular.



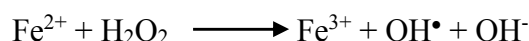
Figura 13 Esquema de los mecanismos de acción a través de los cuales los compuestos de vanadio ejercen sus efectos antitumorales. Adaptado de Evangelou (2002)

1.5.5.2.1 Especies de oxígeno y nitrógeno reactivas (ROS y RNS)

Los radicales libres y todas aquellas moléculas que no siendo radicales son capaces de su formación en ambientes extra e intra celulares, tales como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el oxígeno singulete se encuentran comprendidas en el término especies de oxígeno reactivas (ROS). (Halliwell y Gutteridge 1990).

La primera especie reactiva de oxígeno producida en los sistemas biológicos es el radical anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$), el cual se forma por la reducción directa e incompleta del oxígeno, por un único electrón. El $O_2^{\bullet-}$ tiene una vida media corta, es poco reactivo e inestable debido a que se produce una reacción de dismutación del $O_2^{\bullet-}$ a H_2O_2 (Thannickal y Fanburg 2000). Esta dismutación puede ser espontánea o catalizada por la enzima superóxido dismutasa (SOD). El peróxido de hidrógeno producido en células

eucariotas proviene en su mayoría de la reacción de dismutación, aunque también puede formarse a partir de la reducción directa del oxígeno con dos electrones (Massey, 1994). A diferencia del $O_2^{\bullet-}$, el H_2O_2 es una molécula mucho más estable lo cual le permite difundir fácilmente a través las membranas biológicas, en tanto que éstas son impermeables al $O_2^{\bullet-}$. Además, el H_2O_2 en presencia de metales de transición puede dar lugar al radical hidroxilo OH^{\bullet} a través de la reacción de Fenton:



El OH^{\bullet} es una molécula muy reactiva y con un alto grado de toxicidad ya que puede reaccionar con ácidos grasos poliinsaturados y producir los radicales alcoxilos (RO^{\bullet}) y peroxilos (ROO^{\bullet}).

Por otro lado, tenemos la familia de especies reactivas del nitrógeno, como el radical óxido nítrico (NO^{\bullet}) y el altamente reactivo anión peroxinitrito ($ONOO^-$), que constituyen otra fuente importante de moléculas reactivas en los sistemas biológicos.

Existen diversos mecanismos de acción directamente involucrados en el daño de los tejidos por parte de los ROS/RNS, los más relevantes son el daño en el ADN, de proteínas y lípidos, así como la estimulación de citoquinas proinflamatorias. Éstos también se encuentran relacionados con la regulación del proceso de la muerte celular programada (Valko y col. 2006). Además los ROS pueden tener funciones indirectas como mensajeros secundarios implicados en la regulación génica y en cascadas de transducción de señales como la de quinasas activadas por mitógenos (MAPK) que presentan finalidades fisiológicas (Allen y Tresini 2000; Sastre y col. 2000).

1.5.5.2.2 Daño oxidativo a biomoléculas

Daño al ADN nuclear y mitocondrial

El radical OH^{\bullet} tiende a reaccionar con todos los componentes de la molécula de ADN generando un daño importante tanto en las bases de purinas como de piridiminas y también en el esqueleto de desoxirribosa (Dizdaroglu y col. 2002). Como consecuencia de este daño, puede ocurrir un arresto o inducción de la transcripción, inducción de las vías de transducción de señales, errores en la replicación e inestabilidad genómica, todas asociadas con la carcinogénesis (Marnett 2000; Cooke y col. 2003).

Las RNS como peroxinitritos y óxidos de nitrógeno también están involucrados en el daño al ADN, generando un aducto con potencial para inducir transversiones de G:C→T:A (Brown y Borutaite 2001).

Además del daño al ADN nuclear, varios reportes demuestran la evidencia de daño oxidativo al ADN mitocondrial en procesos de carcinogénesis, encontrando que el mismo es más susceptible a la oxidación que el ADN nuclear (Inoue y col. 2003).

Proteínas

En general las proteínas son resistentes al daño por H_2O_2 y por otros oxidantes a menos que estén presentes metales de transición. El daño catalizado por metales a proteínas implica escisión oxidativa, pérdida de residuos de histidina, la introducción de grupos carbonilos y la formación de radicales alquilo, R^{\bullet} , RO^{\bullet} , ROO^{\bullet} en el centro de las proteínas, los cuales son capaces de clivar uniones peptídicas (Stadtman 1992). En principio el daño generado sobre las proteínas puede ser reparado y se conoce como un evento no letal para las células. Sin embargo, existen evidencias de que dos proteínas

mitocondriales (aconitasa y adenina nucleótido- translocasa) pueden ser blancos importantes de un daño oxidativo a largo plazo (Stadtman 2004). Además, las cadenas laterales de todos los residuos de aminoácidos de las proteínas son susceptibles a oxidación por la acción de ROS/RNS (Stadtman 2004), pero los residuos de cisteína y metionina son particularmente susceptibles (Levine y col. 1996). Sin embargo, esta oxidación es reversible por grupos tiol.

Por otra parte, el radical hidroxilo promueve la abstracción de un átomo de hidrógeno del esqueleto de polipéptidos para formar un radical centrado en un átomo de carbono el cual bajo condiciones aeróbicas reacciona rápidamente con el oxígeno para formar radicales peróxilos (Stadtman 2001) o la forma protonada del superóxido (HO_2^\bullet) (Stadtman 2001).

Lípidos

Los ácidos grasos poliinsaturados de los fosfolípidos son extremadamente sensibles a la oxidación (Esterbauer y col. 1991; Marnett 1999). Todo el proceso de peroxidación lipídica consiste en tres estadios: iniciación, propagación y terminación (Pinchuk y col. 1998; Nyska y Kohen 2002.) y se ven reflejados en la figura 14.

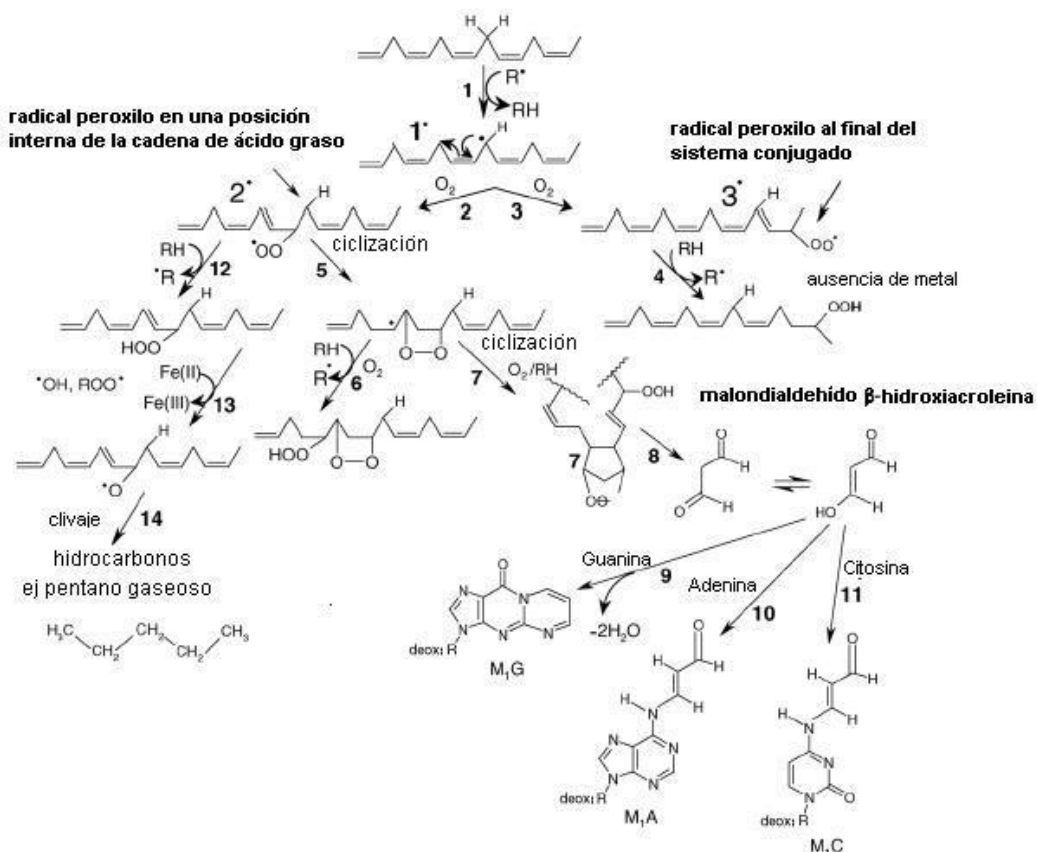


Figura 14 Vías para la peroxidación lipídica. Los grupos metileno de los ácidos poli-insaturados son altamente susceptibles a la oxidación y sus átomos de hidrógeno, después de la interacción con el radical R^\bullet , son removidos para formar radicales con carbono central 1^\bullet (reacción (1)). Estos radicales reaccionan con el oxígeno para formar radicales peróxilos (reacción (2) y (3)). Si el radical peróxilo está en uno de los extremos de la doble unión (3^\bullet), se reduce a hidropéroxido el cual es relativamente estable en ausencia de metales (reacción (4)). Un radical peróxilo localizado en una posición interna del ácido graso (2) puede reaccionar por ciclización para producir un peróxido cíclico adyacente al radical con carbono en el centro (reacción (5)). Éste puede ser reducido para formar un hidroxiperóxido (reacción (6)) o a través de la reacción (7), sufrir una segunda ciclización y formar un peróxido bicíclico, el cual después de acoplarse al oxígeno y reducirse, forma una molécula estructuralmente análoga al endoperóxido. El compuesto 7 es un producto intermediario

de la producción de malondialdehído (reacción (8)). El malondialdehído puede reaccionar con las bases del ADN, guanina (G), adenina (A) y citosina (C) y formar aductos MIG, MIA y MIC (reacciones (9)-(11)). Los radicales peroxilos ubicados en la posición interna de los ácidos grasos (2●) pueden, además de participar en reacciones de ciclización, quitar átomos de hidrógeno de una molécula vecina de ácido graso creando así hidroperóxidos lipídicos (reacción (12)). Éstos pueden después reaccionar con metales por un proceso redox (por ejemplo, con hierro) para producir radicales alcoxilos (RO●) (reacción (13)) los cuales, después de ser clivados (reacción (14)), pueden formar pentano gaseoso; un buen marcador de peroxidación lipídica. Adaptado de Valko y col. (2006).

1.5.5.2.3 Estrés oxidativo y sistemas antioxidantes

El nivel celular de ROS dependerá del balance y equilibrio entre la producción y la capacidad antioxidante de la célula (figura 15). Una producción y acumulación excesiva de ROS o una disminución en la capacidad antioxidante, podría provocar una situación de estrés oxidativo. En la célula existen diversos sistemas antioxidantes que contrarrestan la generación de ROS los cuales se clasifican en dos tipos: primarios y secundarios. Entre los sistemas antioxidantes primarios se encuentran aquéllos capaces de interceptar los ROS evitando la producción de nuevos radicales libres y el consiguiente daño a estructuras celulares. Ejemplos de los mismos son: las superóxido dismutasas (SOD), la glutatión peroxidasa, la catalasa y la tioredoxina reductasa.

Todas las SOD catalizan la reacción de dismutación del $O_2^{\bullet-}$ a H_2O_2 (Kinnula y Crapo, 2004). Existen cuatro formas de la superóxido dismutasa: Cu,Zn- SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), Ni-SOD, y la SOD extracelular.

La catalasa, localizada en los peroxisomas, realiza la conversión del peróxido de hidrógeno a agua, es una de las enzimas conocidas más eficientes ya que posee la ventaja de no saturarse a ninguna concentración de H_2O_2 .

El sistema GSH es probablemente el mecanismo de defensa celular más importante. El tripéptido GSH (γ -Glu-Cys-Gly), no solamente actúa como un secuestrante de ROS, sino que actúa como un sensor regulador del estado redox intracelular. El sistema consiste en el GSH, la glutatión peroxidasa y la glutatión reductasa. La glutatión peroxidasa cataliza la reducción del H_2O_2 y otros peróxidos convirtiendo el GSH a su forma oxidada (GSSG). El GSSG es posteriormente reducido de nuevo a GSH por la glutatión reductasa. En condiciones normales, más del 95% del GSH celular está en forma reducida, así que el ambiente intracelular es primordialmente reductor. Una depleción en los niveles de glutatión se ha relacionado en numerosas ocasiones con el proceso de muerte celular programada aunque la muerte celular no necesariamente siempre va acompañada de dicha disminución (Higuchi 2004; Xu y Thornalley 2001).

Por otro lado, los sistemas antioxidantes secundarios son moléculas que actúan atrapando radicales libres evitando así que éstos inicien reacciones en cadena que podrían dañar estructuras celulares. Algunos ejemplos de éstos son la vitamina C, vitamina E, β caroteno, bilirrubina y albúmina (Valko y col. 2006).

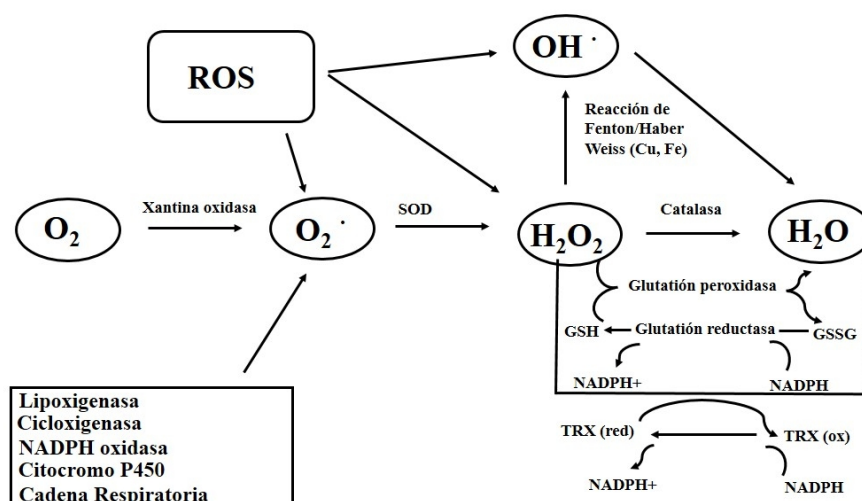


Figura 15 Representación esquemática de los mecanismos de generación de ROS y sistemas antioxidantes celulares. SOD: superóxido dismutasa; GSH: glutatió reducido, GSSG glutatió oxidado; TRX: Tioredoxina. Adaptado de Mercurio y Manning (1999).

1.5.5.2.4 Generación de estrés oxidativo por acción del vanadio

El vanadio puede participar en reacciones que generan radicales libres como se esquematiza en la Figura 16. En primera medida el vanadio(V) es reducido rápidamente a vanadio(IV) en el plasma mediante diversas enzimas y antioxidantes. Las siguientes reacciones tienen lugar dentro de las células (Valko y col. 2006):

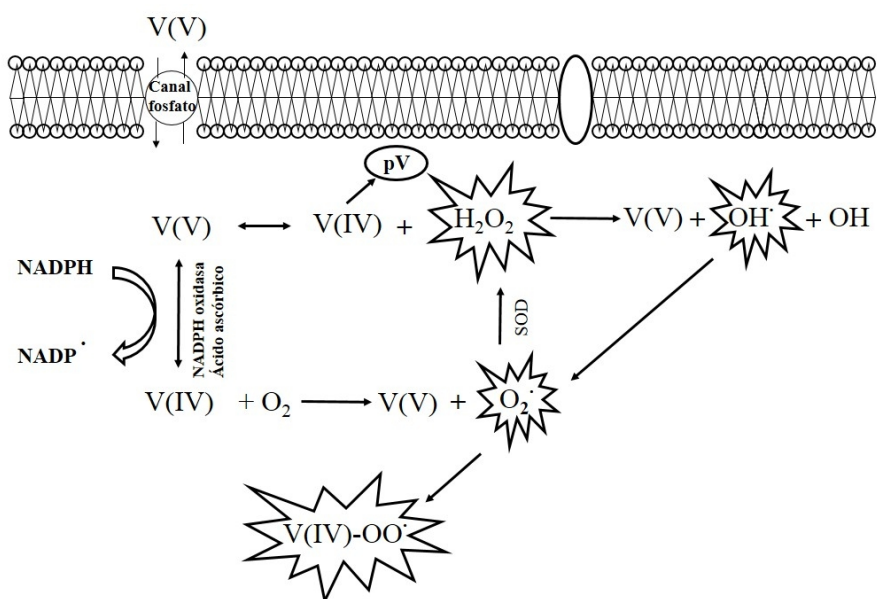
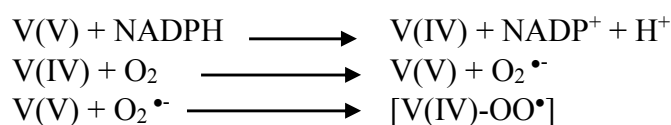


Figura 16 Esquema de la generación de ROS mediada por vanadio.

Los radicales peroxovanadilos e hidroperóxido de vanadilo son los responsables de la peroxidación de lípidos de membrana por acción de compuestos de vanadio (Evangelou 2002), generándose anión superóxido que es posteriormente convertido en H₂O₂ mediante dismutación por la SOD. Además, el vanadio(IV) en presencia de H₂O₂ puede generar especies reactivas mediante reacciones tipo Fenton a través de la siguiente reacción :



La generación de OH[•] puede a su vez generar otros radicales como el anión superóxido el cual puede ser dismutado por la SOD regenerando el H₂O₂ y perpetuando una generación sostenida de OH[•] (Valko y col. 2006). Alternativamente el par V(V)/V(IV) en presencia de H₂O₂ puede generar directamente peroxovanadilos (pV) independientemente de la reacción tipo Fenton (Capella y col. 2007).

1.5.5.2.5 Efectos del vanadio sobre el ciclo y la proliferación celular

El ciclo celular se compone de cuatro fases: síntesis de ADN (fase S), división celular (fase M) y las fases *gap* entre estas dos; G₁ entre fase M y S, y G₂ entre las fases S y M. La progresión del ciclo depende de la activación/ inhibición de un gran número de señales intra y extra celulares junto con controles genéticos intrínsecos, dando como resultado diferentes sitios que controlan el progreso de las distintas fases del mismo. Estos puntos de control son muy importantes ya que determinan si las células progresan en el ciclo, se arrestan en fase quiescente G₀, se diferencian o entran en un proceso de muerte celular programada (Boonstra y Post 2004). La regulación del ciclo está determinada por dos tipos de proteínas: las ciclinas y las quinasas dependientes de ciclina (CDK en mamíferos; cdc en levaduras). Como se observa en la figura 17, la fase G₁ está regulada por el complejo ciclina D-CDK4/6, mientras que la entrada y progresión a través de la fase S está regulada por los complejos ciclina E- y ciclina A-CDK2. Por último, la transición de la fase G₂/M está regulada por el complejo ciclina B-CDK1/2.

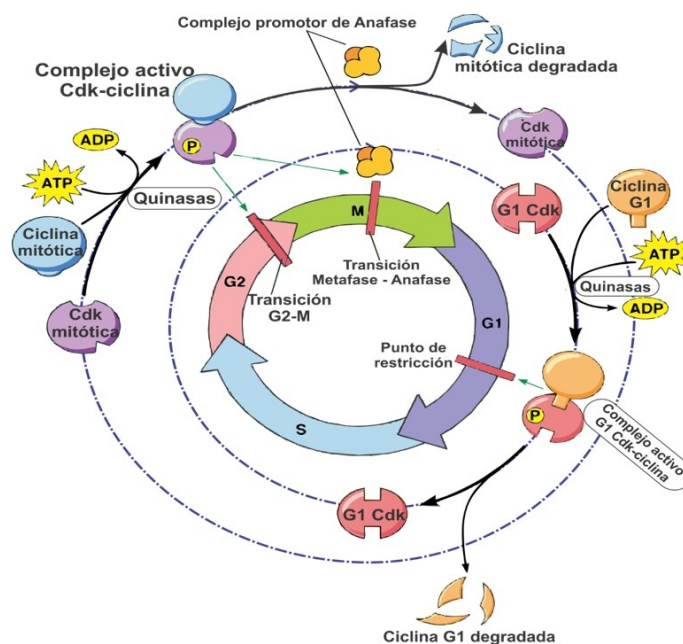


Figura 17 Ciclo celular de células de mamíferos. G0, fase quiescente; R, punto de restricción de fase G1 después del cual las células no dependen de señales externas para la progresión en el ciclo celular; S punto de control de fase S; M punto de control de fase M; Sp punto de control del huso mitótico.

Los complejos de vanadio tienen la capacidad de estimular la proliferación celular, inhibirla o en algunos casos, exhibir un comportamiento bifásico, es decir, promover la proliferación celular a bajas concentraciones e inhibir este proceso a dosis altas (Evangelou 2002). Es por esto que los metalocompuestos de vanadio poseen efectos contrapuestos y éstos dependerán de la dosis utilizada, de la especie de vanadio presente y del tipo celular.

Los efectos mitogénicos del vanadio pueden estar mediados por la vía de las MAPKs, que activa indirectamente quinasas como las ERKs y la PI3-K. Las ERKs a su vez estimulan distintos factores de transcripción que promueven el ingreso de la célula en el ciclo celular y así su proliferación (Pandey y col. 1995; Pandey y col. 1999). La activación de la PI3-K activa la vía de las ERKs y la PKB aportando a través de ambas vías a la acción mitogénica del vanadio (Wilkinson y Millar 2000).

Los efectos antiproliferativos de los compuestos de vanadio en líneas celulares tanto normales como tumorales son producidos en su mayoría a través del arresto del ciclo celular mediado por la inhibición de PTPasas y generación de estrés oxidativo (Morinville y col. 1998; Evangelou 2002). El vanadio en sus diversas formas puede arrestar las distintas fases del ciclo celular, pero la fase que es detenida parece depender de la línea celular.

En fase G₁, el vanadato redujo la actividad de ciclina D en células de melanoma, después de 2 h de incubación (Strasberg y Rieber 1995). En la transición G₁/S, el arresto del ciclo celular por el complejo VO(acac)₂ ocurre a través de la disminución de la fosforilación de la proteína supresora de tumor pRb. Esta proteína promueve el avance a fase S y la expresión de las ciclinas A, D y E mediada por una activación sostenida de las ERKs en células de hepatocarcinoma HepG2 (Fu y col. 2008). Además, complejos de vanadio(IV) con derivados de fenantrolina y tiosemicarbazonas generan arresto del ciclo celular en la fase G₁/S mediado por ROS en diferentes líneas celulares humanas derivadas de hepatocarcinomas (Zhang y col. 2013).

En fase S, el arresto del ciclo celular involucra a la proteína p53. Esta misma activa la transcripción del gen p21 aunque la activación también puede ser independiente de ésta.

En células epidermales de ratón C141 p53 +/+, el vanadato incrementa los niveles de p53 y de p21 y produce el arresto del ciclo (Zhang y col. 2002). La activación de p53 es producida por la generación de H₂O₂ inducida por el vanadato (Huang y col. 2000). El mecanismo propuesto es que al producirse daño en el ADN por ROS, se activan vías de transducción de señales como la de las MAPKs que en consecuencia producen el incremento de p53 y su fosforilación (Zhang y col. 2003).

La transición G2/M es también afectada por el vanadio y sus derivados (Faure y col. 1995; Zhang y col. 2001; Meshkini y Yazdanparast 2010). El arresto del ciclo celular por acción del vanadato en células epiteliales de pulmón A549 está mediado por la generación de ROS (particularmente H₂O₂) y están implicadas diversas vías regulatorias: 1) activación de p21, 2) incremento de la expresión de Chk1 e inhibición de cdc25C, lo cual no permite la desfosforilación de cdc2 con la consecuente inactivación del complejo ciclina B-cdc2. En células T98 de glioma el vanadato causa arresto en G2/M e hipofosforilación de Rb (Chin y col. 1999). El vanadato también genera arresto en G2/M en células humanas tumorales derivadas de próstata (PC-3). Esto está mediado por ROS que degradan e inhiben la cdc25C (Liu y col. 2012).

En células tumorales, los peroxovanadatos bloquean la transición G2/M del ciclo celular de manera reversible a bajas concentraciones e irreversiblemente a concentraciones altas (Faure y col. 1995). El arresto del ciclo celular está mediado por la inhibición de PTPasas, que desfosforilan las subunidades del complejo ciclina-B. Interesantemente, el bloqueo del ciclo celular en el estado de transición G2/M parece estar relacionado con la apoptosis (Farinelli y Greene 1996). Estos datos sugieren que el vanadio podría inhibir la proliferación de células por dos procesos: inducción de p53 e inhibición de la PTPasa cdc25.

Por último, el vanadio puede actuar en fase M inhibiendo la formación del huso mitótico y alterando el ensamblaje de los microtúbulos (Ramirez y col. 1997; Mailhes y col. 2003).

1.5.5.2.6 Efectos del vanadio sobre la muerte celular programada (apoptosis)

Diversos compuestos de vanadio modulan la fosforilación de proteínas claves en las vías de señalización relacionadas con la producción de ROS y daño al ADN (Pandey y col. 1995; Morinville y col. 1998; Huang y col. 1998; Ding y col. 1999; Chen y col. 1999). Algunas de estas proteínas involucradas en esas vías son la AP-1, MEK-1, ERK-1, JNK-1, PI3-K y NF-K β .

La activación de NF-K β es una de las más relevantes ya que éste regula la expresión de una variedad de genes cuyos productos median la respuesta inflamatoria y regulan la progresión del ciclo celular conduciendo hacia la protección de la apoptosis o hacia la muerte celular (Mercurio y Manning 1999; Bours y col. 2000).

Existen otras vías de señalización activadas por el vanadio que conducen a la apoptosis. La generación de ROS inducida por compuestos de vanadio puede producir daños en la mitocondria y generar la liberación de citocromo *c* la cual activa a diversas caspasas. Estas caspasas activadas (caspasa-3 y caspasa-8) provocan aún más daños en la mitocondria y activan a sustratos como poli(ADP-ribosa)-polimerasa, conduciendo a la apoptosis (Green y Reed 1998; Burkle 2000.). La activación de p53 también está implicada entre los mecanismos del vanadio para inducir apoptosis. En células epidermales de ratón, JB6 P⁺, la generación de H₂O₂ mediada por el vanadato, activa a p53 y disminuye el potencial de membrana mitocondrial induciendo la apoptosis (Huang y col. 2000). Otros derivados como el ortovanadato induce apoptosis dependiente de caspasas e interfiere con la cascada de señalización PI3K/Akt/mTOR en células cancerígenas de tiroides (Goncalves y col. 2011).

Diversos complejos de vanadio(V) y derivados de peróxidos mostraron una disminución de la viabilidad celular, de la expresión de H-ras conjunta a una activación de apoptosis mediada por ROS en células humanas cancerígenas de mama y pulmón (Petanidis y col. 2013).

En esa misma línea de estudio, un complejo de vanadato(V) con bisperoxopicolinato incrementó considerablemente los niveles de apoptosis atenuando la expresión de fosfatasas como CDC25A en diversas líneas celulares de glioma pediátricos de bajo grado de incidencia (Ajeawung y col. 2013).

Además, un complejo de vanadato con tiosemicarbazona como ligando generó un incremento en la apoptosis de células osteoblásticas normales y tumorales, con el consecuente incremento de ROS y la activación de la vía de señalización ERK (Rivadeneira y col. 2010).

Por otro lado, la exposición a V_2O_5 de neuronas de rata cultivadas *in Vitro*, evidenció un significativo aumento en la apoptosis de las mismas a través de la activación de la expresión de caspasa 3 y del gen Bax, así como de la disminución en la expresión del gen Bcl-2 (Zhonghua y col. 2013).

Este mismo compuesto generó un incremento en la muerte celular programada mediada por ROS y por la producción de óxido nítrico en células endoteliales en cultivo (Montiel-Dávalos y col. 2011).

Para el caso del vanadio(IV), el $VOSO_4$ inhibe la proliferación induciendo apoptosis de manera dosis respuesta en queratinocitos humanos. Esta activación de la apoptosis está asociada con una disminución en la regulación de las ciclinas D₁ y E y con un aumento en la regulación de la oncoproteína c-fos, así como una alteración de la familia de proteínas Bcl-2 (Markopoulou y col. 2009).

Por otro lado, los complejos de oxovanadio(IV) con derivados de quinolinas evidenciaron un significativo aumento de la apoptosis en células de leucemia por una vía aparentemente independiente de la activación de caspasas (Yamaguchi y col. 2012).

Además, complejos de oxovanadio(IV) con derivados de piridoxales mostraron una acción selectiva en el daño sobre células tumorales de pulmón y melanoma por sobre células normales de pulmón, queratinocitos y linfocitos de sangre periférica. Estos compuestos indujeron un incremento selectivo de la muerte celular programada mediada por ROS en las células tumorales en comparación con las de fenotipo normal (Strianese y col. 2013).

En resumen, la evidencia indica que los compuestos de vanadio activan diferentes vías de señalización celular que conducen a la activación/inhibición tanto de genes apoptóticos como antiapoptóticos. En el caso de los genes apoptóticos predomina la activación de caspasas iniciadoras y efectoras que conducen a la célula a la muerte celular programada.

1.5.5.2.7 Potencial antimetastásico del vanadio

El efecto del vanadio sobre la fosforilación de ciertas proteínas con funciones claves en la invasión y metástasis del cáncer, puede influenciar el potencial invasivo y metastásico de las células tumorales.

Las proteínas de adhesión (célula-célula o célula-matriz) están implicadas en la invasión y metástasis del cáncer y al ser modificadas por los compuestos de vanadio pueden modificar el potencial metastásico regulando la adhesión célula-sustrato (Takenaga y col. 1996), el contacto célula-célula y la inducción de cambios en la actina del citoesqueleto (Matsuyoshi y col. 1992; Dharwan y col. 1997; Luber y col. 2000).

Se ha demostrado que ciertos compuestos de vanadio pueden prevenir la colonización de vasos sanguíneos activando la fibrinólisis endógena inducida por tumores e inhibiendo la

agregación de plaquetas, eventos que están involucrados en la metástasis hematogénica del cáncer (Biggerstaff y col. 1999; Zhou y col. 2000). Un ejemplo de esto se da con el pervanadato el cual es capaz de inhibir la inducción de proteínas de adhesión celular ICAM-1, V-CAM-1 y ELAM-1 en células endoteliales a través de la inhibición de PTPasas y consecuente regulación negativa del factor de necrosis tumoral (TNF). La inhibición de PTPasas por el pervanadato bloquea también el anclaje de monocitos a células endoteliales (Dharwan y col. 1997). El tratamiento sostenido con pervanadato provoca la pérdida del contacto célula-célula e induce cambios en la actina del citoesqueleto debido a la fosforilación de tirosina de componentes del complejo de adhesión celular en células de carcinoma gástrico (Luber y col. 2000). Además, la potenciación por vanadato de la fosforilación de proteínas en residuos de tirosinas, inhibe la agregación mediada por caderinas (adhesión célula-célula) de células de rata 3Y1 transformadas (Matsuyoshi y col. 1992). El tratamiento sostenido con pervanadato provoca la pérdida del contacto célula-célula e induce cambios en la actina del citoesqueleto debido a la fosforilación de tirosina de componentes del complejo de adhesión celular en células de carcinoma gástrico (Luber y col. 2000). Otro metalofármaco de vanadio(III) con L-cisteína demostró su capacidad antimetastásica en ratas que fueron inyectadas con 3,4-benzopireno. Los resultados revelan que el compuesto previene de forma significativa la metástasis en pulmón generada por la adición del carcinogénico (Papaioannou y col. 2004).

1.5.6 Efectos antitumorales del vanadio sobre animales de experimentación

Este elemento y sus derivados han presentado marcados efectos anticancerígenos tanto en tumores inducidos experimentalmente o implantados en modelos animales. (Jackson y col. 1997; El - Naggar y col. 1998; Narla y col. 2000; Mukerjee y col. 2004, Bhisayee y col. 2010). Evangelou y su grupo demostraron que un complejo de vanadio con L-cisteína administrado oralmente, producía efectos antitumorales en ratas a las que les habían implantado un tumor. Este estudio mostró que en las ratas tratadas con vanadio se retardó la tasa de crecimiento del tumor aumentando el tiempo de supervivencia e induciendo remisión completa del mismo (Evangelou y col. 1997). En concordancia, otros grupos observaron efectos similares al administrar intraperitonealmente complejos de vanadio en modelos tumorales animales (Jackson y col. 1997; El - Naggar y col. 1998; Liasko y col. 1998; Gosh y col. 2000). Este efecto citotóxico parece correlacionarse con un aumento en la producción de ROS, en la inducción de apoptosis, así como también por interacción con el DNA, que condujeron al arresto del ciclo celular (Thompson y col. 1984; Djordjevic 1995; Aubrecht y col. 1999; El - Naggar y col. 1998; Evangelou 2002). Otros posibles mecanismos estarían probablemente relacionados con la actividad antineoplásica del vanadio, como la inhibición de la DNA polimerasa, la nucleotidil transferasa, así como también la fosforilasa (Liasko y col. 1998). Las especies de vanadio(IV) y vanadio(V) pueden inducir clivaje del ADN, probablemente por medio de la producción de ROS, especialmente $\cdot\text{OH}$ (Sakurai 1994).

Sin embargo, los mecanismos subyacentes en la acción antitumoral ejercida *in vivo* de los complejos de vanadio permanecen sin dilucidarse completamente.

Diversos reportes demuestran el potencial accionar antitumoral del vanadio en modelos animales. Un ejemplo de esto son los efectos antiproliferativos encontrados para el monovanadato de amonio en un modelo experimental de ratas inducidas con 7,12 dimetilbenzoalfaantraceno. Luego de la inducción de una preneoplasia mamaria con la adición del carcinogénico se realizó el tratamiento con el compuesto de vanadio por 24

semanas, lo que redujo la incidencia, multiplicidad y tamaño del tumor. Los mecanismos de acción descritos para tal efecto involucran una inducción de apoptosis y un aumento en la expresión de p53 y de Bax (Ray y col. 2007).

Por otro lado, Kanna y col. analizaron los efectos antitumorales por parte del vanadio en un modelo de ratas con cáncer de colon inducido por el agregado de 1,2 dimetilhidrazina. Los efectos observados mostraron que la adición de monovanadato disminuyó los niveles de aberración en la superficie generados por el carcinogénico sobre las criptas del colon. Aquellos animales tratados con el carcinogénico y suplementados con vanadio mostraron un considerable mejoramiento en la arquitectura general del colon con un menor número de criptas aberrantes encontradas. Además, se observó una marcada recuperación en el status redox de la célula, ya que el grupo de animales tratados con vanadio incrementaron sus niveles de glutatión -S- transferasa (GST) y de citocromo P-450 (Kanna y col. 2005).

1.5.7 El vanadio en el hueso.

El papel preponderante del vanadio en el hueso nace de diversos estudios realizados con el fin de tratar de establecer la esencialidad del mismo y su relación con la formación del esqueleto (Uthus y Nielsen 1990; Nielsen 1995). Diversos estudios sobre la absorción, metabolismo y excreción de vanadio evidenciaron una acumulación preferencial en hueso, riñón e hígado (Setyawati y col. 1998). Además, se demostró que la cantidad de vanadio en el hueso es del orden de 10-26 $\mu\text{g/g}$, el doble de las encontradas en el riñón y 10 veces más altas que las encontradas en el hígado. (Mongold y col. 1990; Ramanadham 1991; Yuen y col. 1993; Dai 1994; Setyawati y col. 1998).

La acumulación de vanadio en el hueso puede deberse a su analogía con el fosfato, al cual puede estar sustituyéndolo en los cristales de hidroxiapatita (Etcheverry y col. 1984; Narda y col. 1992). También se cree que la gran cantidad de vanadio en el riñón se debe a que éste es excretado por la orina (Hopkins y Tilton 1966; Nielsen 1995). Por otro lado, la presencia de vanadio en el hígado y el bazo parece estar asociada a que el mismo se une con gran afinidad a las proteínas ferritina y transferrina, con funciones claves en el almacenamiento y transporte de hierro (Chasteen y col. 1986).

Con el fin de estudiar los efectos del vanadio en el hueso se trataron ratas Zucker diabéticas con un complejo de oxovanadio(IV) y bismatolato (0,8 mg/ml) examinándose luego la tibia y las vértebras de los animales (Poucheret y col. 1998). El contenido de vanadio en los huesos de las ratas tratadas fue de 9,4 $\mu\text{g/g}$ para la tibia y de 6,6 $\mu\text{g/g}$ para las vértebras y la presencia del mismo no afectó el contenido de otros minerales como el K, Mg, Na, Ca y P. Tampoco se afectaron la arquitectura, la densidad mineral ósea y las propiedades mecánicas del hueso en las dosis que poseen efectos insulino miméticos (Pouruchet y col. 1998). Otros reportes como el de Anke y colaboradores, demostraron en cabras una relación directa entre deficiencias óseas y dietas pobres en vanadio (Anke y col. 1990).

1.6 Fisiología de los osteoblastos

Los osteoblastos son responsables de la síntesis y secreción de proteínas de la matriz extracelular (MEC) que servirán como base para la formación del hueso ya que éstos se disponen formando una monocapa sobre la superficie de formación ósea y se comunican por uniones tipo *gap*. Luego de formar la MEC los osteoblastos pueden quedar atrapados por el material intercelular para formar osteocitos, morir por apoptosis o convertirse en células aplanadas de revestimiento.

Otra característica importante de los osteoblastos es que sintetizan cantidades abundantes de fosfatasa alcalina, colágeno tipo I, el factor de transcripción Cbfa-1, la osteocalcina y osteopontina.

1.6.1 Modelos de células de tipo osteoblasto murino y humano.

Las células en cultivo proveen un modelo simple en el cual se pueden estudiar diversos fenómenos biológicos. La línea celular que deriva de calvaria de ratón denominada **MC3T3-E1**, es un modelo preosteoblástico que puede diferenciarse en osteoblastos que alcanzan diferentes estadios de maduración en cultivo. Además, provee un sistema adecuado para examinar los procesos de formación de la MEC y las respuestas a diferentes fármacos y metabolitos durante el desarrollo y la formación ósea. Esta línea celular, en su fase proliferativa, tiene una morfología fibroblástica y crece en monocapas, tiene la capacidad de diferenciarse a osteoblastos, presentando diferentes marcadores específicos y mineralizar la MEC formando hidroxapatita madura *in vitro* (Sudo y col. 1983). Así, las células MC3T3-E1 muestran una expresión de las características del desarrollo osteoblástico en función del tiempo, similares a las del hueso *in vivo* (Quarles y col. 1992; Barrio y Etcheverry 2006).

Finalmente, se puntualiza que en este trabajo de Tesis doctoral, cuando mencionamos a la línea celular MC3T3-E1 como línea de “fenotipo normal” hacemos referencia a que presenta inhibición por contacto, que es una de las características distintivas de las líneas celulares no transformadas.

Otro modelo utilizado en estudios *in vitro* de células de tipo osteoblasto murino es la línea **UMR106** derivada de un sarcoma osteogénico de rata, que fue preservado por trasplante en la misma colonia de ratas. Esta línea tiene la característica fenotípica de un osteoblasto diferenciado pero inmaduro, expresando altos niveles de colágeno de tipo I y fosfatasa alcalina; pero no expresa osteocalcina, ni osteonectina. Esta línea se utiliza como un buen modelo para el estudio de efectos mediados por hormonas y diversos compuestos químicos en osteoblastos maduros (Partridge y col. 1983; Barrio y Etcheverry 2006).

El principal modelo de estudio *in vitro* utilizado en esta tesis fue la línea celular MG-63 derivada de un osteosarcoma humano la cual fue aislada y caracterizada por Heremans y col. Esta línea celular presenta un cariotipo anormal y una elevada producción de interferón (Heremans y col. 1978).

Esta línea es ampliamente utilizada debido a su alta tasa proliferativa consecuencia de la pérdida de la inhibición por contacto característica de los osteosarcomas, así como por su capacidad para diferenciarse. Es por esto que es considerada una línea que posee muchas de las características propias de los osteoblastos (Prouillet y col. 2004, Aubin 1998). Esta línea celular es utilizada principalmente para evaluar efectos de citoquinas, drogas, hormonas y factores de crecimiento, así como también para evaluar las ventajas de distintos biomateriales empleados en terapias reparadoras de hueso (Herath y col. 2005, Stanley y col. 2006).

Mohseny y col. afirman que la línea MG-63 es un modelo de estudio representativo para abordar temáticas relacionadas a la malignidad y la biología general del osteosarcoma y al descubrimiento de drogas frente a éste (Mohseny y col. 2011).

Estos mismos autores recomiendan el uso de esta línea celular para la formación de esferoides y estructuras 3D para el estudio y el descubrimientos de nuevas terapias antitumorales (Mohseny y col. 2012).

1.7 Cáncer

1.7.1 Definición y tipos de cáncer

Las células normales sólo proliferan cuando reciben señales provenientes de otras células del organismo. Sin embargo, los controles que regulan la multiplicación celular se pueden alterar, cuando esto ocurre las células comienzan a crecer y a proliferar sin responder a la regulación, dando como resultado células capaces de expandirse en forma indefinida, las cuales originan una masa denominada tumor. Algunos de estos tumores son benignos y no tienen consecuencias en la salud, pero otros son malignos y se diseminan por todo el organismo produciendo la enfermedad conocida como cáncer (Lewin, 2007).

Así, el cáncer es una enfermedad que se caracteriza principalmente por una proliferación celular descontrolada localizada en una parte específica del cuerpo.

El término cáncer engloba a más de 200 formas de la enfermedad, de acuerdo con el tejido afectado; cabe mencionar en relación al cáncer que existen distintas variedades de morfología y grado de malignidad diferente (McDonald et al., 2004). Los mismos se clasifican en dos grandes grupos: sarcomas (neoplasias malignas que se originan en un tejido conjuntivo, como pueden ser hueso, cartílago, grasa, músculo, vasos sanguíneos, u otros) y son los tumores más comunes del tejido óseo, y carcinomas que son los tumores más frecuentes derivados de células epiteliales o glandulares. Generalmente, el desarrollo de un cáncer comprende muchas etapas, cada una de las cuales está gobernada por múltiples factores: entre ellos tenemos los dependientes de la constitución genética de los individuos y otros que son dependientes de su entorno, ambiente y modo de vida.

1.7.2 Características del cáncer

Las células cancerosas tienen alterados los controles normales de proliferación y en general crecen respondiendo a señales internas estimuladoras de la proliferación celular. Esto produce un crecimiento sin límites, infiltrando los espacios que dejan entre sí los tejidos vecinos y logrando penetrar a los vasos sanguíneos y linfáticos a través de los cuales viajan hacia otras partes del cuerpo generando el fenómeno conocido como metástasis. Para esto las células tumorales producen niveles elevados de receptores de superficie celular específicos de las proteínas y los polisacáridos que componen las láminas basales y secretan enzimas que digieren estas proteínas (Lewin, 2007 y Weinberg, 2006).

1.7.3 Epidemiología del cáncer

El cáncer es la principal causa de muerte a escala mundial. Se le atribuyen 8,2 millones de defunciones ocurridas en todo el mundo en 2012. Los principales tipos de cáncer son los siguientes: pulmonar (1,59 millones de defunciones); hepático (745.000 defunciones), gástrico (723.000 defunciones), colorrectal (694.000 defunciones); mamario (521.000 defunciones); cáncer de esófago (400.000 defunciones).

Los dos primeros tipos de cáncer que causan el mayor número de defunciones en mujeres son, el cáncer de mama y el de cuello del útero, mientras que para los hombres son el pulmón y en segundo lugar el cáncer de próstata. La Argentina se encuentra incluida en el rango de países con incidencia de cáncer media-alta (172,3-242,9 x 100.000 habitantes), de acuerdo a la estimación realizada por la International Agency for Research on Cancer (IARC) en el año 2012.

http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx

1.7.4 Osteosarcoma y terapia antitumoral

El osteosarcoma es el tumor primario maligno óseo más común (Link y col. 1986). Existen 3 tipos principales: osteoblásticos, condroblástico y fibroblástico. Además es uno de los tumores humanos más heterogéneo ya que posee características microscópicas muy variables incluso en zonas distintas del mismo tumor. Una de las principales características del mismo es la expresión constitutiva de la enzima COX-2 (Dickens y col. 2003).

En la actualidad, los tratamientos coadyuvantes con fármacos antineoplásicos son muy utilizados como complemento a los métodos locales de tratamiento, tales como la radioterapia o la cirugía, aunque la naturaleza del tratamiento y sus métodos cambian constantemente. El tratamiento del osteosarcoma, ya sea primario o como consecuencia de metástasis óseas se realiza habitualmente con análogos del ácido fólico (metotrexato), antibióticos antraciclínicos (doxorrubicina), análogos del pirofosfato (bifosfonatos) y complejos de platino (cisplatino y, en menor medida, carboplatino) (Hamdy 1993; Goodman et al 1996).

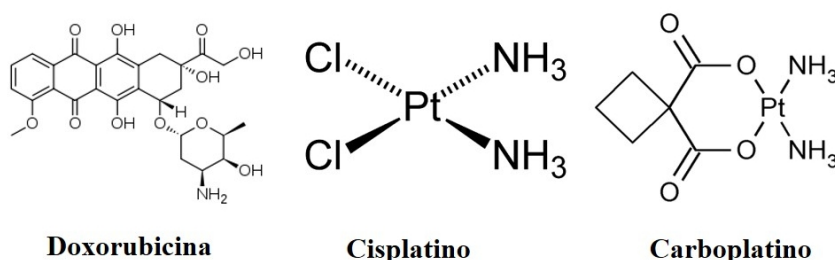


Figura 18 Estructuras químicas de los principales agentes antineoplásicos utilizados para el tratamiento de los osteosarcomas y las metástasis óseas

A continuación se considera el rol de las galectinas (familia de proteínas que poseen la capacidad de unirse a residuos sacarídicos presentes en diversas glicoproteínas de la membrana plasmática y la matriz extracelular) con respecto al desarrollo tumoral y en relación con los mecanismos de acción antitumoral de diversos metalofármacos.

1.8. Galectinas

1.8.1 Aspectos generales y clasificación

Las galectinas constituyen una familia de proteínas muy conservadas en la evolución que participan en diversos eventos biológicos. Estas tienen la capacidad de descifrar glicocódigos específicos en distintas biomoléculas complejas situadas tanto en la membrana celular como en la matriz extracelular. Estas proteínas poseen un dominio de 135 aminoácidos filogenéticamente conservado desde invertebrados inferiores a mamíferos conocido como dominio de reconocimiento de carbohidratos (DRC), el cual interacciona con la estructura Gal β 1 \rightarrow 4 NAcGlc)_n presentes en N- y O- glicanos. (Cooper, 2002). Actualmente, se han identificado 15 galectinas en mamíferos, que han sido clasificadas por su estructura bioquímica en: “prototipo”, “quimera” y “repeticiones en tándem” (Fig. 19) (Yang y col., 2008).

Las galectinas “prototipo” (galectinas 1, 2, 5, 7, 10, 13, 14 y -15) poseen un único DRC y pueden formar homodímeros generando de este modo proteínas funcionalmente bivalentes.

La única galectina tipo “quimera” descrita es la Galectina 3 que posee un DRC en el extremo C-terminal y un dominio N-terminal no relacionado que facilita su oligomerización (Rabinovich y col., 2007). Esta galectina desempeña su función a través de una interacción dual, ya que interacciona con carbohidratos a través de su DRC situado en el dominio carboxi-terminal y con otros ligandos, como polipéptidos y polinucleótidos, a través de su dominio amino-terminal rico en prolina, glicina y tirosina.

Las galectinas del tipo “repeticiones en *tándem*” (galectinas 4, 6, 8, 9 y 12) tienen dos DRCs en una misma cadena polipeptídica, por lo cual son naturalmente bivalentes aunque cada DRC tenga la capacidad de interactuar con dos carbohidratos diferentes (Cooper, 2002).

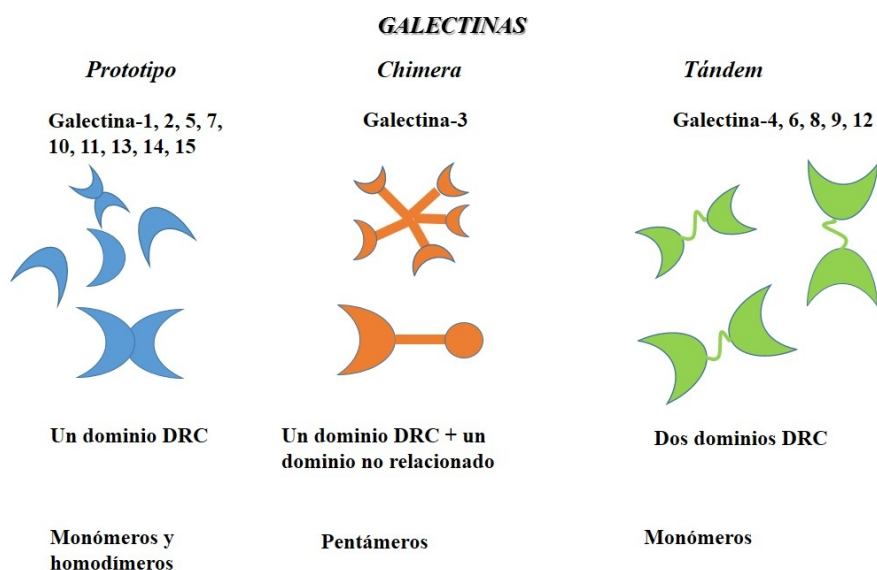


Figura 19 Clasificación estructural de las galectinas.

Se ha observado que estas proteínas de unión a carbohidratos ejercen sus efectos biológicos a través del reconocimiento de azúcares específicos en ligandos intracelulares, receptores de membrana y glicoproteínas extracelulares.

La ejecución de sus funciones varía en forma considerable de acuerdo a su localización subcelular, la regulación de su expresión, y el estado de activación celular (Rabinovich, 1999). Con respecto a la localización subcelular, ciertas galectinas como la 1 y la 3, se expresan en una amplia variedad de tejidos mientras que otras poseen un patrón de expresión más acotado, como la galectina-4 que se expresa en el sistema gastrointestinal, galectina-7 en queratinocitos, galectina-10 en eosinófilos, y galectina-12 en tejido adiposo (Cerliani y col., 2011).

La figura 20 muestra las principales funciones intracelulares y extracelulares descritas para las galectinas (Rabinovich y col., 2007).

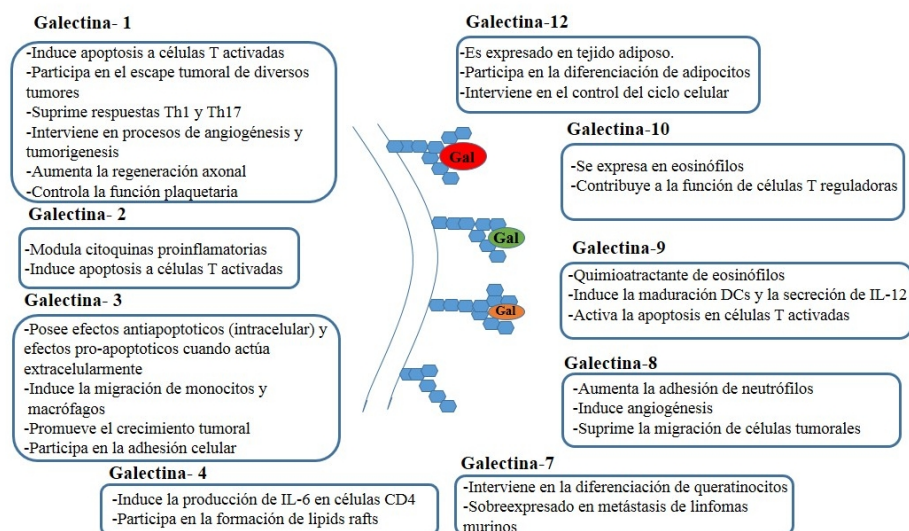


Figura 20 Efectos de las galectinas en diversos sistemas biológicos. Diferentes funciones han sido atribuidas a los diversos miembros de esta familia de proteínas, en esta figura se muestran algunas de las más relevantes. (Adaptado de Yang y col, 2008)

1.8.2 Galectina-1 (Gal 1) y Galectina-3 (Gal 3) : efectos biológicos y su relación con el cáncer

Uno de los hallazgos más importantes de los últimos años está asociado a la expresión abundante de Galectina-1 en diversos tipos de tumores tales como próstata, melanoma, ovario, mama, pulmón, hígado, páncreas y colon (Barrow y col. 2011, Carlini y col. 2014, Espelt y col. 2011, Xue y col. 2011). Además en la mayoría de estos tumores la expresión de Gal 1 se asocia a la malignidad, la alteración del ciclo celular y al potencial metastásico de los mismos (Danguy y col., 2002; Liu & Rabinovich, 2005). Estos aspectos poseen una relevancia clínica muy importante ya que permiten utilizar la Gal 1 como un biomarcador de malignidad y progresión tumoral (Liu & Rabinovich, 2005). En este contexto, también se ha demostrado que esta galectina juega un papel transcendental en fenómenos de escape tumoral modulando la producción de citoquinas anti-inflamatorias y la supervivencia de células T (Rubinstein y col., 2004, Le y col., 2005. Kuo y col., 2011). En ese sentido es importante destacar que esta proteína es capaz de inhibir la proliferación y expansión clonal de linfocitos T activados, utilizando diversos mecanismos de acción (Blaser y col., 1998; Rabinovich y col., 2007a, Rabinovich y col. 2000). En lo que respecta al osteosarcoma, recientemente se ha reportado la importancia y relación de la expresión de Gal 1 con la malignidad, progresión y metástasis tumoral del mismo tanto en células en cultivos (MG-63, U-2OS) como en animales de experimentación, indicando a la Gal 1 como un posible blanco para la terapia antitumoral (Miao y col. 2014). Recientes avances muestran un rol fundamental de la Galectina-3 en eventos como la angiogénesis, la regulación de la inmunidad innata, la migración celular, la apoptosis y el progreso de la carcinogénesis en diversos tipos de tumores (Chung y col. 2013, Funasaka y col. 2014, Fortuna-Costa y col. 2014).

1.8.3 Galectinas y biometales

La interacción y relación entre galectinas y diversos metales es un tema poco abordado pero de creciente interés en los últimos años. Un ejemplo de esto es reportado por Tsao y col. quienes reportaron que el cromo(IV) genera un incremento en la expresión de Gal 1 en el estómago y el colon de ratas expuestas a diferentes concentraciones del carcinogénico Cr(IV) (Tsao y col. 2011).

En concordancia con esto, Yazihan y col. reportaron la relación existente entre el aumento de la expresión de Gal 3 inducida por cadmio (II) en tejido cardíaco (Yazihan y col. 2011). Para el caso del arsénico, Chang y col. encontraron que la disminución en la expresión de Gal 1 estaría mediando los efectos apoptóticos de este metal en fibroblastos 3T3 y células KB (cáncer oral), por lo cual la proteína podría usarse como marcador de la toxicidad inducida por el arsénico (Chang y col. 2011).

Otro reporte interesante indica que en células de melanoma (TM1) la expresión de Gal 3 se pierde durante la progresión del tumor. Borges y col. generaron una expresión *de novo* de la Gal 3 en esa misma línea de melanoma, observando una mayor susceptibilidad farmacológica al tratamiento con complejos de cobre con derivados de piridinas. De esto surge una posible estrategia terapéutica anti-melanoma para líneas celulares que expresen Gal 3 a través de tratamientos con complejos de cobre (Borges y col. 2013).

2. OBJETIVOS

“La vida sin problemas es matar el tiempo a lo bobo” Luzbelito y las sirenas, Luzbelito 1996, Patricio rey y sus redonditos de ricota

En función de los antecedentes expuestos los objetivos de la presente tesis doctoral son :

1-Realizar un *screening* de la actividad antitumoral en líneas celulares humanas de hueso y colón de fenotipo normal y tumoral de diversos metalocompuestos con diversos ligandos como por ejemplo flavonoides (crisina y silibinina), ligandos de interés biológico que presentan grupos funcionales aptos para la coordinación con metales como por ejemplo quinolinas o compuestos con varios átomos coordinantes como el oxodiacetato, diversos heterociclos como 2,2' bipyridina y la o-fenantrolina, y finalmente, compuestos de naturaleza inorgánica como los polioxometalatos.

2- Evaluar los efectos de los metalofármacos y de sus precursores sobre la cito- y genotoxicidad.

3- Investigar los posibles mecanismos de acción de los metalocompuestos bioactivos involucrados en sus propiedades antitumorales en esas líneas celulares.

4- Investigar las propiedades antitumorales de aquellos compuestos seleccionados por su mayor actividad *in vitro*, en un modelo de ratones N:NIH(S) *FoxI^{nu}* inoculados con células de osteosarcoma humano MG-63, para evaluar su capacidad antitumoral en un sistema *in vivo*.

3. RESULTADOS

**“Con lo que cuesta armar un full,
armar algún puto full”, Gualicho,
Ultimo Bondi a Finisterre, 1998,
Patricio rey y sus redonditos de ricota**

3.1. Estabilidad en solución

La estabilidad en solución de todos los compuestos utilizados en la tesis fue llevada a cabo a través del análisis del espectro UV–visible en un rango de tiempo de entre 0 a 24 h. Los resultados obtenidos evidenciaron que todos los compuestos son estables en esos tiempos de trabajo ya que no se observó ningún tipo de modificación en sus espectros correspondientes, salvo para los compuestos $[\text{VO}(\text{NH}_2\text{O})_2(\text{val})]$ y $[\text{VO}(\text{NH}_2\text{O})_2(\text{met})]$ que solo fueron estables en sólido durante 2 meses.

3.2 Heteropolioxometalatos (HPOMs): estudio de la actividad biológica de una isoserie $[(\text{PW}_9\text{O}_{34})_2\text{M}_4]^{10-}$ con $\text{M}=\text{Cu}(\text{II}), \text{Mn}(\text{II}), \text{Co}(\text{II}), \text{Zn}(\text{II})$ en células de osteosarcoma humano MG-63 en cultivo.

La síntesis y caracterización espectroscópica de todos los HPOMs anteriormente citados, fueron reportadas por (Cabello y col. 2004). Estos fueron sintetizados por la Dra. Gabriela Egusquiza y la Dra Carmen Cabello (CINDECA, CONICET), quienes sin ningún tipo de inconveniente lo donaron para la investigación exhaustiva de su acción biológica en osteoblastos en cultivo como parte de este trabajo de Tesis doctoral.

3.2.1 Estudios de viabilidad celular

3.2.1.1 Ensayo del Cristal violeta en células de osteosarcoma humano (MG-63)

Este ensayo se basa en la incorporación del colorante vital cristal violeta a ciertas estructuras subcelulares (particularmente mitocondrias) de las células metabólicamente activas pero no de las células inactivas. De esta forma nos permite estimar el porcentaje de células sobrevivientes debido a la acción de los quimioterapéuticos, ya que solo las células que están vivas incorporarán el colorante. Es decir, hablamos de inhibición de la viabilidad celular por parte de los compuestos cuando la captación de colorante por parte de las células tratadas es menor que la captación del mismo por parte de las células sin tratar (condiciones basales).

En la figura 21 se muestran los resultados obtenidos para las células de osteosarcoma MG-63 mediante el ensayo de cristal violeta luego de incubar las células con concentraciones (2,5-100 μM) de la serie isomorfa $[(\text{PW}_9\text{O}_{34})_2\text{M}_4]^{10-}$ con $\text{M}(\text{II}) = \text{Co}, \text{Mn}, \text{Zn}$ y Cu durante 24 h.

Los estudios realizados en la línea MG-63 de osteosarcoma humano muestran que el compuesto con cobre demostró ser el más potente de la serie como inhibidor de la viabilidad celular en todo el rango de concentraciones testado.

Luego de 24 hs de incubación observamos que el HPOM con cobre(II) genera efectos deletéreos significativos tanto a 25 como 50 μM en comparación con los HPOM de Zn y $\text{Co}(\text{II})$. Para concentraciones más altas como 75 y 100 μM observamos que los tres compuestos se comportan de la misma manera en cuanto a potencia antitumoral respecta. Es importante destacar que debido a estos resultados se decidió elegir al HPOM con cobre(II) denominado “ PW_9Cu ” para continuar con el detallado estudio de la citotoxicidad y de los mecanismos de acción involucrados en su acción antitumoral.

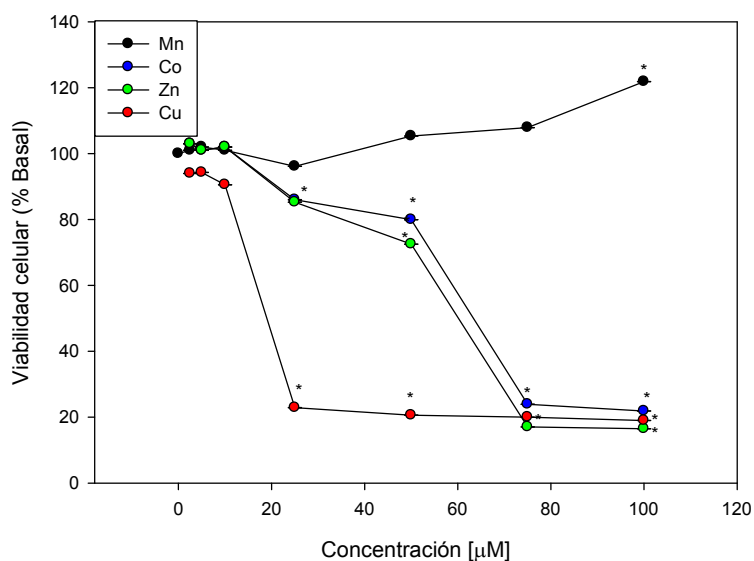


Figura 21 Efecto de la isoserie $[(PW_9O_{34})_2M_4]^{10-}$ con $M=Cu(II)$, $Mn(II)$, $Co(II)$, $Zn(II)$ sobre la viabilidad celular de células MG-63. Los resultados están expresados como el porcentaje del Basal y representan la media \pm SEM de 3 ensayos diferentes ($n=16$), *significativo con respecto al Basal.

3.2.1.2 Efectos de PW_9Cu sobre otras líneas osteoblásticas tumorales y normales.

Con el objetivo de evaluar los efectos del compuesto PW_9Cu sobre otras líneas osteoblásticas, se midió el efecto de éste sobre la línea tumoral de osteosarcoma de rata (UMR106) y la línea de fenotipo normal osteoblástica (MC3T3-E1).

La figura 22 muestra los efectos del PW_9Cu sobre las 3 líneas osteoblásticas MC3T3-E1, UMR106 y MG-63. Como observamos en esta el compuesto disminuye considerablemente la viabilidad celular desde los 25 μM para la línea MG-63, mientras que para la línea celular UMR106 esa disminución se da en el rango de 50-100 μM ($p < 0.01$). Por el contrario, solo observamos acción deletérea del compuesto sobre la línea celular osteoblástica de fenotipo normal a 75 y 100 μM , evidenciándose un menor efecto de daño sobre la línea de fenotipo normal por sobre las tumorales. El efecto deletéreo de este sobre las tres líneas osteoblásticas sigue el siguiente patrón $MC3T3-E1 < UMR106 < MG-63$, con los valores de IC_{50} siguientes 92, 81 y 23 μM , respectivamente. Estos resultados en su conjunto nos indicarían que la acción diferencial del PW_9Cu sobre las líneas tumorales osteoblásticas por sobre la de fenotipo normal lo convierte en un interesante y potencial candidato antitumoral para ser posteriormente evaluado.

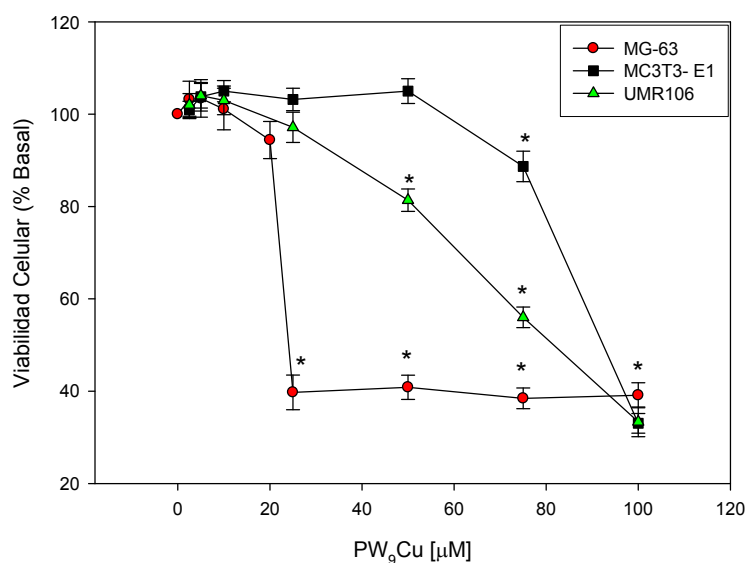


Figura 22 Efecto del compuesto de la isoserie $[(PW_9O_{34})_2M_4]^{10-}$ con $M=Cu(II)$ sobre la viabilidad celular de células osteoblásticas MC3T3-E1 y UMR106. Los resultados están expresados como el porcentaje del Basal y representan la media \pm SEM de 3 ensayos diferentes (n=16), *significativo con respecto al Basal.

3.2.1.3 Efectos de PW₉Cu sobre la actividad lisosomal y mitocondrial.

Los lisosomas de células metabólicamente activas presentan la capacidad de captar el colorante rojo neutro (RN), siendo éste un ensayo usualmente empleado para determinar la citotoxicidad de diversos compuestos. Por otro lado, es ampliamente conocido que aquellas células metabólicamente activas deben presentar actividad mitocondrial (ensayo MTT) y que dicha actividad está relacionada con su viabilidad.

Los efectos del PW₉Cu sobre la actividad lisosomal en la línea celular MG-63 son observados en la figura 23. En esta podemos ver que el compuesto genera una pérdida significativa de la captación del colorante por los lisosomas a partir de 25 µM y mostrando una tendencia que no responde a la dosis-respuesta ($p < 0,01$). Por otro lado, en la figura 23 se observó un efecto inhibitorio sobre la actividad mitocondrial en concentraciones de 25 a 100 µM, con una respuesta similar a la encontrada para el ensayo de captación de RN. A 25 µM el compuesto genera un 70% de muerte celular manteniéndose invariable ese valor de muerte celular en el resto de las concentraciones más altas testeadas ($p < 0,01$).

Los resultados obtenidos para estos dos ensayos de citotoxicidad son similares a los observados en el ensayo del cristal violeta, por lo cual la alteración de la actividad de los lisosomas y de la mitocondria podría ser uno de los factores que juegan un rol de vital importancia en la actividad antiproliferativa de este compuesto.

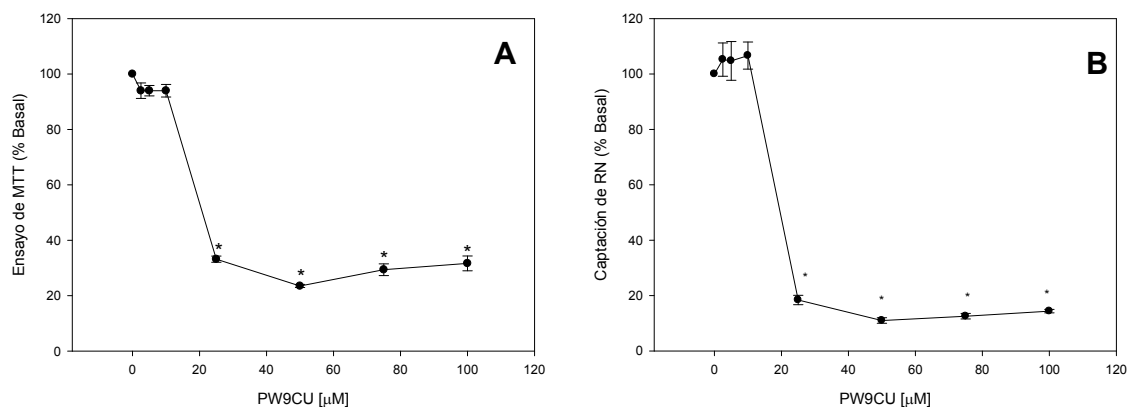


Figura 23 Reducción del MTT(A) y captación de rojo neutro (B) por células de osteosarcoma humano en cultivo luego de 24 h de incubación con PW₉Cu. Los resultados están expresados como la media ± SEM, n=16 , *p<0.01

3.2.2 Cambios morfológicos

3.2.2.1 Tinción con sondas fluorescentes

Para visualizar los efectos deletéreos del PW₉Cu, se investigó la acción de estos sobre la morfología celular. En el panel superior de la figura 24 observamos los efectos de 25 y 100 μM del compuesto luego de 6 h de incubación. En esta vemos que a 25 μM hay una ligera deformación de la estructura nuclear sugiriendo que hay eventos tempranos de fragmentación nuclear. A 100 μM observamos profundas alteraciones en la estructura celular en la cual el citoplasma se encuentra colapsado y el núcleo condensado y fragmentado. Luego de 24 hs de incubación (panel inferior, figura 24) observamos un alto nivel de fragmentación y condensación nuclear en todas las células. Estos resultados demuestran el efecto de la concentración y el tiempo con respecto a los efectos deletéreos generados por el PW₉Cu sobre la morfología celular.

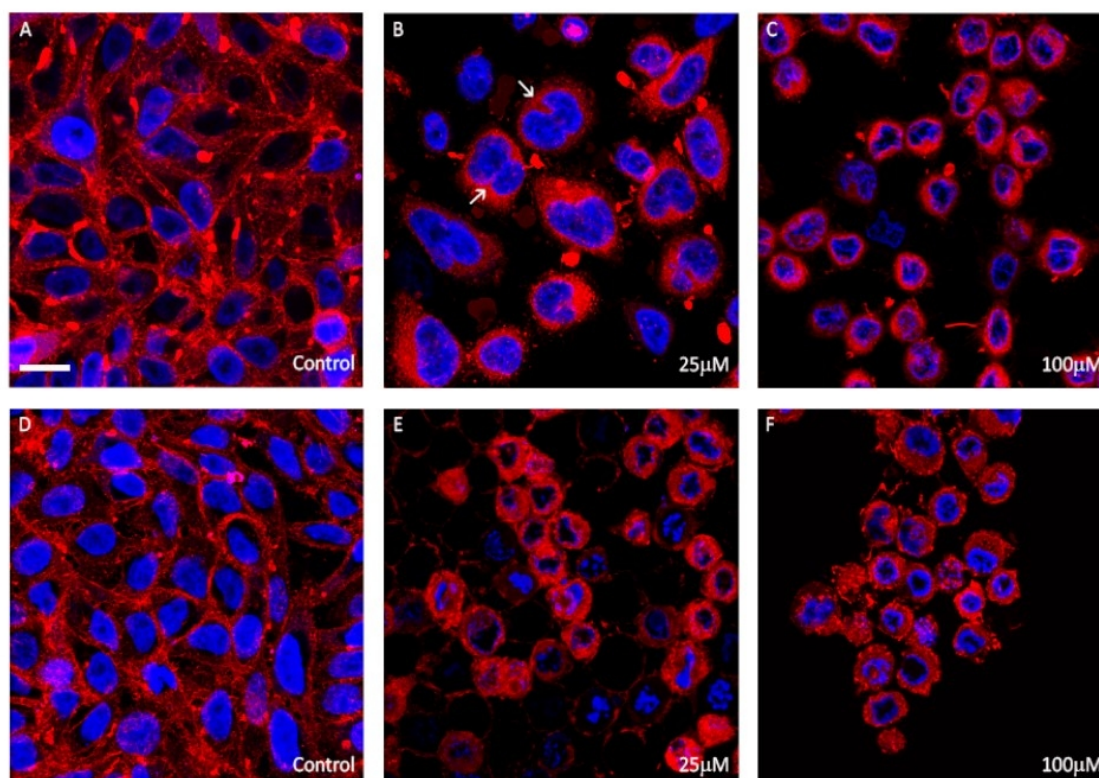


Figura 24 Efecto de PW_9Cu sobre la morfología de las células MG-63. Las células fueron incubadas con el compuesto por 6 h (panel superior, A: Control B: 25 μM C: 100 μM) y 24 h (panel inferior D: Control E: 25 μM F: 100 μM). Posteriormente fueron teñidas con TOPRO-3 (azul) y CellMask (rojo) y observadas bajo microscopio confocal de fluorescencia (barra de escala = 20 μm)

3.2.3 Mecanismos de acción

Se investigaron los posibles mecanismos de acción involucrados en los efectos antiproliferativos que podría utilizar el compuesto PW_9Cu en su acción antitumoral. Para esto se determinó el estrés oxidativo a través de la medición de los niveles de especies de oxígeno reactivas (ROS), la disminución de la relación GSH/GSSG y el efecto del compuesto sobre el ciclo celular, la apoptosis y los cambios en la expresión de Gal 1 y Gal 3.

3.2.3.1 Estrés oxidativo

3.2.3.1.1 Generación de especies reactivas del oxígeno (ROS)

Con el fin de visualizar el efecto del estrés oxidativo como mecanismo de acción antitumoral generado por el PW_9Cu , se estudió el efecto de éste sobre la producción de ROS en la línea celular MG-63, utilizando la sonda DHR 123.

Los resultados de la figura 25 muestran que el compuesto genera un incremento en los niveles de ROS a partir de 25 μM con una tendencia dosis-respuesta hasta los 100 μM ($p < 0,01$). Para el caso de 25 μM el aumento de ROS fue del 261% con respecto al basal, mientras que para 100 μM se llegó a un valor de 345% ($p < 0,01$).

Estos resultados son congruentes con los observados en los ensayos de viabilidad celular y citotoxicidad, demostrando que la generación de ROS podría ser uno de los mecanismos de acción relacionados con los efectos antitumorales de los complejos de vanadio en estudio.

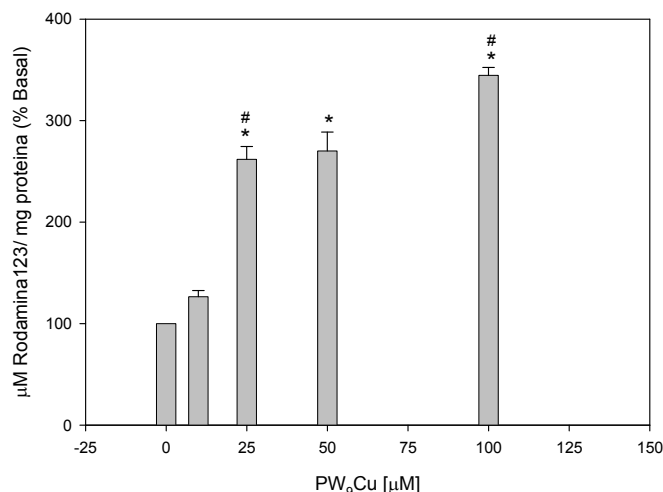


Figura 25 Generación de ROS en la línea celular MG-63 en presencia de PW₉Cu. Las células fueron incubadas por 24 h a 37° C con concentraciones crecientes del complejo (10-100 µM). La producción de ROS de las células se midió mediante la oxidación de DHR123 a Rodamina123. Los valores representan la media ± SEM, n=15, * p<0,01 significativo respecto al control; #p<0,01 significativo entre dosis empleadas (25 y 100 µM).

3.2.3.1.2 Estudios de viabilidad celular en presencia de *scavengers* de ROS

Para dilucidar el rol fundamental de la generación de ROS como mecanismo de acción del PW₉Cu en la línea celular MG-63, se llevaron a cabo los ensayos midiendo la viabilidad celular por cristal violeta en presencia de una mezcla equimolar de vitaminas C y E (*scavengers* de ROS).

Los resultados observados en la figura 26 muestran que el agregado de *scavengers* de ROS aumentan el porcentaje de viabilidad celular desde 25 a 100 µM (p<0,01). A 25 µM observamos que el aumento de viabilidad celular llega hasta valores cercanos al control, los cuales son consistentes con lo observado en la generación de ROS (en la cual a 25 µM se generó 261% con respecto al basal, mientras que para 100 µM se llegó a un valor de 345%). Estos resultados demuestran el rol principal que tiene la generación de ROS en la actividad antitumoral de este compuesto.

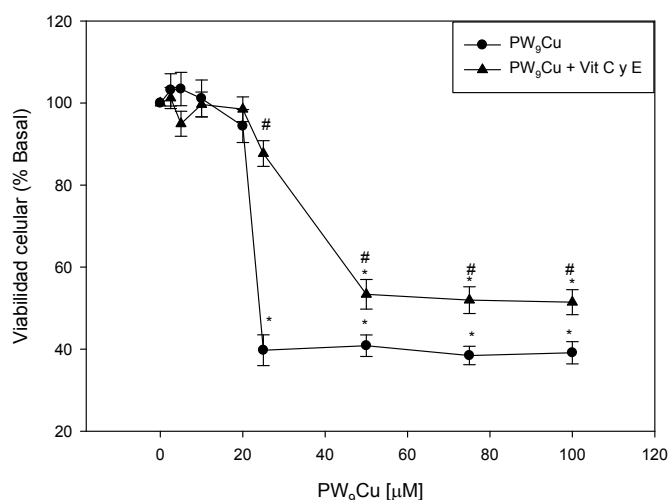


Figura 26 Efectos del PW₉Cu sobre la viabilidad celular de células MG-63 en presencia de una mezcla de vitaminas C y E. Las células fueron incubadas con distintas concentraciones de PW₉Cu o PW₉Cu + Vit C y E (50 µM c/u) durante 24 h. Los resultados expresan la media ± SEM, n=16., *p<0,01 estadísticamente significativo con respecto al control, #p<0,01 significativo a su correspondiente dosis en ausencia de vitaminas.

3.2.3.2 Balance redox

3.2.3.2.1 Status redox celular. Determinación de glutatión reducido (GSH) y oxidado (GSSG).

La generación excesiva de ROS puede producir un desbalance del estado redox intracelular, en el cual el glutatión tiene un rol fundamental. Por esto, se determinó la relación de los niveles de GSH y GSSG después de tratar las células con 25, 50 y 100 µM del PW₉Cu por 24 h. Estos resultados se observan en la figura 27 donde la relación GSH/GSSG disminuye en el rango de 25-100 µM (p<0,01). Al igual que para el caso del ensayo de ROS observamos un menor efecto a 25 que a 100 µM del compuesto evidenciándose la acción diferencial con respecto a la concentración.

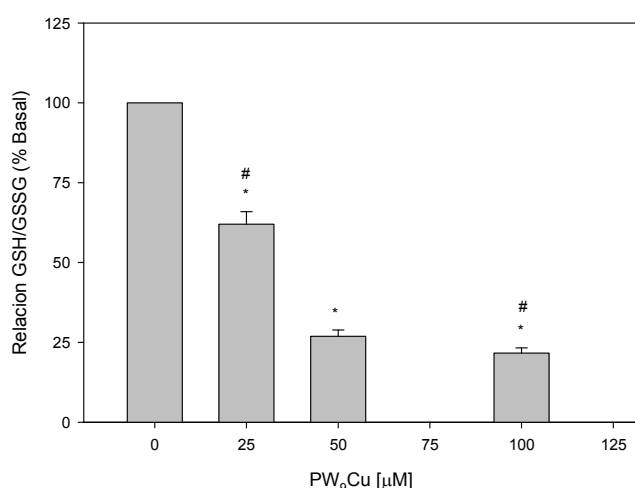


Figura 27 Relación GSH/GSSG en la línea MG-63 en presencia de distintas concentraciones de PW₉Cu. Los resultados expresan la media ± SEM de tres ensayos independientes, *p<0,01 estadísticamente significativo con respecto al control, #p<0,01 significativo entre concentraciones testeadas.

3.2.3.2.2 Estudios de viabilidad celular en presencia de GSH.

Para confirmar el rol que juega el GSH en los mecanismos de defensa y protección para la célula cuando ésta es expuesta a la acción de los metalofármacos, se decidió realizar los ensayos que miden viabilidad celular en presencia de GSH. Para esto, se realizó una preincubación con 1 mM de GSH durante 2 h y luego se agregaron concentraciones de cada complejo desde 2,5-100 μM por 24 h. Los resultados indicaron que existe una recuperación de la viabilidad celular de 25 a 100 μM , en donde se observó que a 25 μM el efecto de recuperación de la viabilidad fue similar al del control, a diferencia de lo que ocurre a 100 μM en donde la recuperación es menor debido a que la generación de daños citotóxicos es mayor.

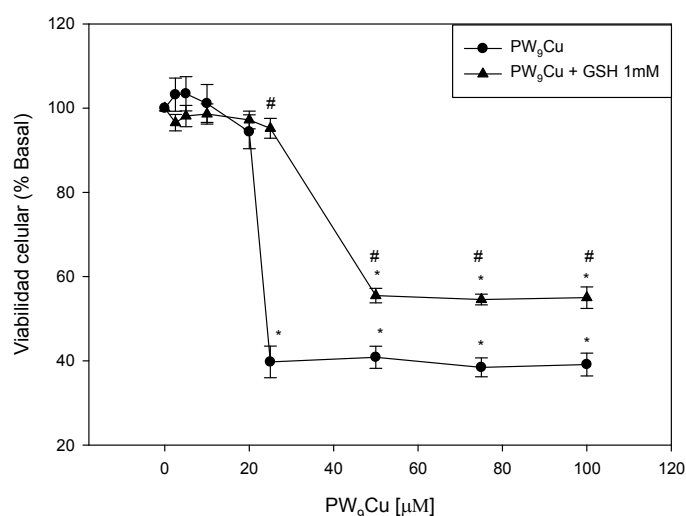


Figura 28 Efectos del PW₉Cu sobre la viabilidad celular de células MG-63 en presencia de GSH. Las células fueron incubadas con distintas concentraciones de PW₉Cu o PW₉Cu + GSH 1mM durante 24 h. Los resultados expresan la media \pm SEM, n=16., *p<0,01 estadísticamente significativo con respecto al control, # p<0,01 significativo a su correspondiente dosis en ausencia de GSH.

3.2.3.3 Apoptosis

3.2.3.3.1 Estudio de la externalización del residuo de Fosfatidilserina (PS) por annexina V

La apoptosis es un proceso fisiológico de muerte celular potenciado por la presencia de agentes injuriantes. Un indicador importante de las etapas tempranas de la apoptosis es la externalización del fosfolípido fosfatidilserina a la cara externa de la membrana plasmática, el cual es cuantificado utilizando anexina acoplado a un fluoróforo. La tabla 1 muestra la cuantificación de células apoptóticas Anexina V(+)/ IP(-) y Anexina V(+)/ IP(+) incubadas con 25 y 100 μM de PW₉Cu por 24 h. Los porcentajes de estas se incrementan cuando incubo con 100 μM de PW₉Cu a un 29% y un 66% con respecto al 10% y 5% observados para el control. Para el tratamiento con 25 μM no se observaron diferencias significativas para ambas poblaciones celulares (p<0,01).

Los resultados de apoptosis muestran una correlación directa con aquellos resultados observados en los ensayos de viabilidad celular, citotoxicidad y generación de ROS.

Tabla 1 Cuantificación de células Anexina V(+)/ PI (-) y Anexina V(+)/PI(+) como indicadores de apoptosis temprana y tardía (extraído de la figura 9). * $p < 0,01$ estadísticamente significativo con respecto al control.

PW ₉ Cu [μ M]	Anexina V (+)	Anexina V (+) / PI (+)
0	10 % \pm 2	5 % \pm 2
25	12 % \pm 1	7 % \pm 1
100	29 %* \pm 4	66 %* \pm 5

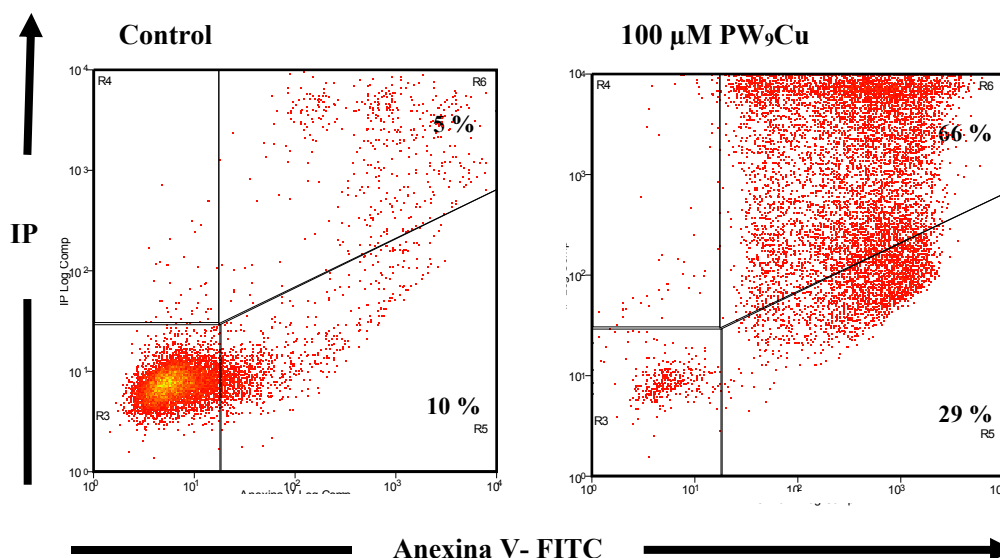


Figura 29 Efectos de PW₉Cu en la apoptosis celular (MG-63) determinada por citometría de flujo mediante la tinción con Anexina V/ Ioduro de Propidio (IP). Las células fueron tratadas durante 24 h con 0 (basal), 25 y 100 μ M del compuesto. Los plots son representativos de tres experimentos independientes. Los números indican el porcentaje de células Anexina V(+)/(-) y V(+)/(+) positivas

3.2.3.4 Estudio del arresto sobre las fases del ciclo celular

Para complementar los estudios de apoptosis se decidió estudiar la acción de los complejos sobre el ciclo celular debido a que muchos de los compuestos quimioterapéuticos más utilizados tienden a afectar alguna fase del ciclo celular para detener el crecimiento y progreso de las células tumorales.

El arresto del ciclo celular y la progresión de la apoptosis fueron medidos en función de la concentración y del tiempo de incubación.

Los resultados indican que a 25 μ M el compuesto generó un arresto en fase G₂/M tanto a 24 como a 48 h, en donde se observa un incremento de células arrestadas en función del tiempo (Figura 30). A 100 μ M podemos observar tanto para 24 h y 48 h que se produce un incremento de células en el pico sub G₁ del 22% significativo con respecto al control que mostró un 5% ($p < 0,01$), demostrando que a esta concentración el compuesto envía las células directamente a apoptosis a diferencia de lo sucedido a 25 μ M. Estos resultados complementan la información obtenida en el ensayo de anexina V en el cual observamos efectos similares con respecto a la concentración y el tiempo.

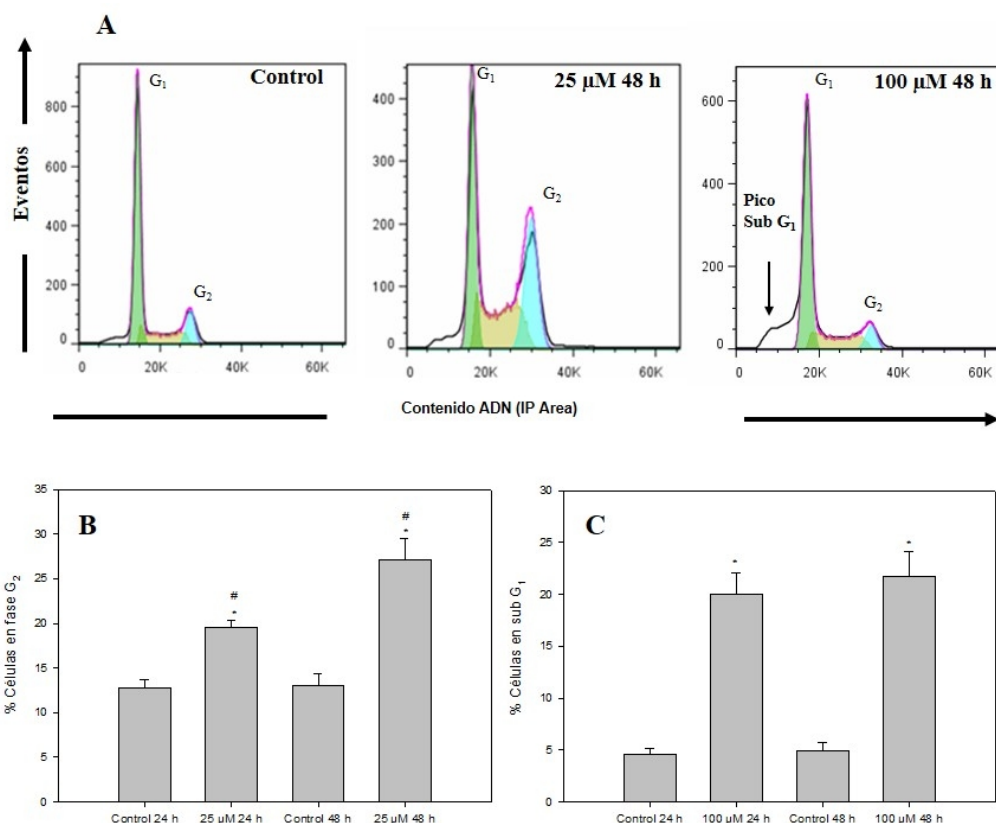


Figura 30 Efectos de PW₉Cu sobre el arresto del ciclo celular (B) y la fragmentación del ADN (C). A. Los plots son representativos de tres experimentos independientes. B. Las células fueron tratadas durante 24 h con 0 (basal) y 25 μ M de PW₉Cu. C. Las células fueron tratadas durante 24 h con 0 (basal) y 100 μ M de PW₉Cu. Los resultados expresan la media \pm SEM, n=9., *p<0,01 estadísticamente significativo con respecto al control, # p<0,01 significativo entre concentraciones testeadas

3.2.3.5. Rol de las galectinas 1 y 3 (Gal 1 y Gal 3) en los mecanismos de muerte celular.

3.2.3.5.1 Análisis de los cambios en la expresión de Gal 1 y Gal 3

Los cambios en la expresión de las Gal 1 y Gal 3 inducidas por el PW₉Cu en la línea celular MG-63 fueron investigados utilizando la técnica de RT-PCR (ARNm) y western blot (proteína). Para esto se probaron tres concentraciones del compuesto (100, 250 y 500 μ M) y dos tiempos de incubación comprendidos en 3 y 6 h en los cuales no tenemos daños citotóxicos por parte del compuesto, los cuales fueron estudiados utilizando el ensayo de MTT. La figura 31A muestra que luego de 3h de incubación con el compuesto se observó una disminución en los niveles de expresión de ARNm de Gal 3 en las tres concentraciones testeadas (p<0,01) mientras que solo se evidenció ese cambio para Gal 1 cuando incubamos con 500 μ M del compuesto. Luego de incubar con 6 h (Fig 31B) los resultados mostraron una disminución en la expresión de ambas galectinas para el tratamiento con 100 μ M de PW₉Cu, mientras que se observó un incremento de esa expresión a 500 μ M

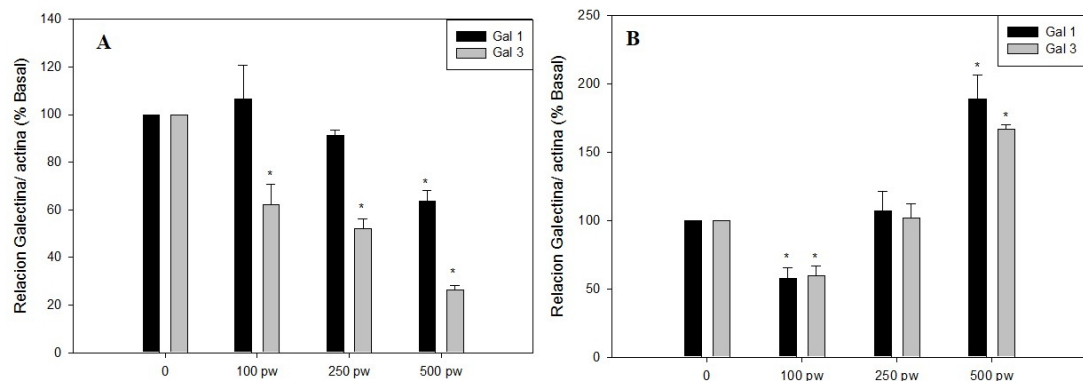


Figura 31 Efectos de PW₉Cu sobre la expresión del ARNm de Gal 1 y Gal 3. A. Las células fueron tratadas durante 3 h con 0 (basal), 100, 250 y 500 μ M de PW₉Cu. B. Las células fueron tratadas durante 6 h con 0 (basal), 100, 250 y 500 μ M de PW₉Cu. Los resultados expresan la media \pm SEM, n=9., *p<0,01 estadísticamente significativo con respecto al control

Los análisis de expresión de ambas galectinas por western blot se observan en la figura 32. Los resultados de la figura 32A indicaron que luego de 3 h de incubación con el PW₉Cu se observó una disminución de los niveles tanto de Gal 1 como Gal 3 para 100 y 250 μ M mientras que no se observan efectos con respecto al control cuando el tratamiento se realiza con 500 μ M de PW₉Cu. Para 6 h se evidenció un resultado similar con la diferencia de que para 500 μ M existe un aumento significativo en la expresión de Gal 1 obteniéndose un valor de 240 % en la relación de Gal 1 con el gen de referencia utilizado (α -Tubulina) por sobre el 100% del control. Estos resultados son congruentes con lo observado para la expresión de los mensajeros para ambas galectinas en la figura 31, demostrando una correlación directa en los cambios de expresión entre el ARNm y la proteína. En su conjunto de estos resultados se desprende que la expresión de ambas galectinas es regulada de forma negativa a concentraciones bajas e intermedias (100 y 250 μ M) mientras que a concentraciones altas (500 μ M) ambas galectinas son sobre reguladas. Esto demuestra que la regulación de la expresión de ambas galectinas es dependiente de la concentración de compuesto testada.

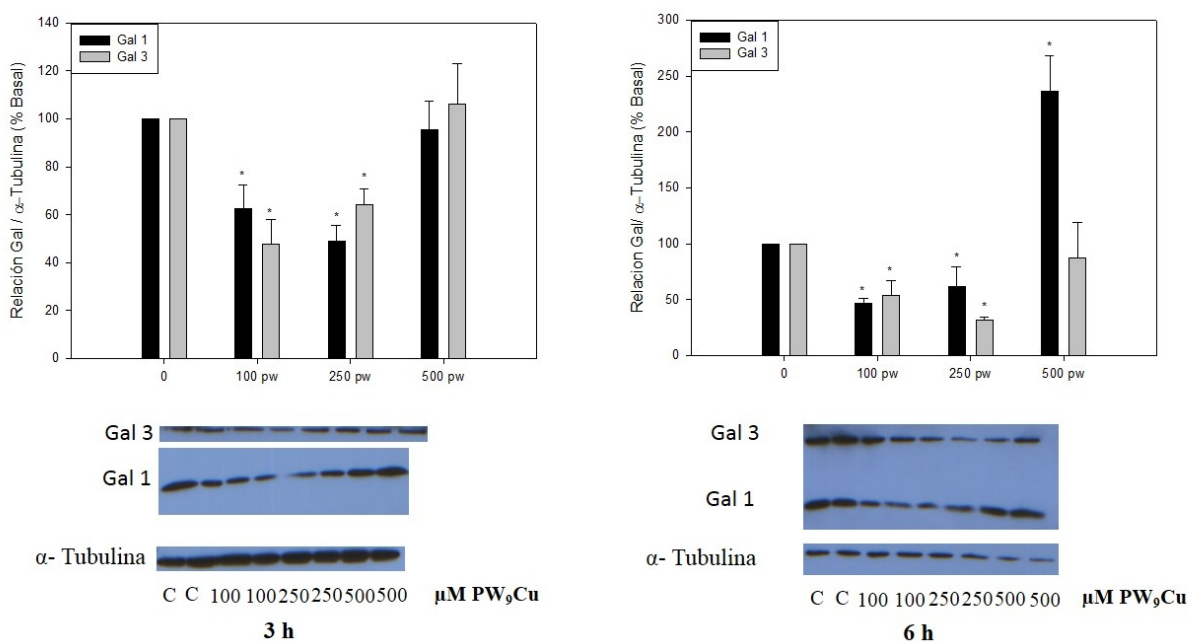


Figura 32 Efectos de PW₉Cu sobre la expresión de Gal 1 y Gal 3 (western blot). **A.** Las células fueron tratadas durante 3 h con 0 (basal), 100, 250 y 500 μM de PW₉Cu. **B.** Las células fueron tratadas durante 6 h con 0 (basal), 100, 250 y 500 μM de PW₉Cu. Los resultados expresan la media ± SEM, n=9., *p<0,01 estadísticamente significativo con respecto al control.

3.3 Compuestos de platino: estudio de la actividad biológica de dos complejos de platino(II) con ligandos derivados de 8 aminoquinolina (CR-163) y 8-hidroxiquinolina (CR-175) en células de osteosarcoma humano MG-63 en cultivo

Dentro de la familia de los ligandos orgánicos utilizados en esta tesis se encuentran aquellos derivados de quinolinas como son la 8 aminoquinolina y la 8-hidroxiquinolina. Este tipo de ligandos posee un amplio espectro de actividades biológicas en las que se destacan el uso como bactericidas, fungicidas y antitumorales. Por otro lado, a pesar del conocido éxito del *cis*-platino en el tratamiento de diferentes tipos de tumores existen dos limitaciones en el uso de la droga que son los efectos secundarios generados por la misma (nauseas, nefrotoxicidad, alta citotoxicidad, etc) y la quimioresistencia sobre otros tumores frecuentes como colon o pulmón. Estas limitaciones marcan la necesidad de generar nuevas estructuras análogas con el fin de mejorar los efectos antiproliferativos en aquellos tumores que poseen quimioresistencia para el *cis*-Pt y a su vez disminuir los efectos secundarios generados por el mismo. En concordancia con esto se sintetizaron dos complejos de platino(II) con 8-aminoquinolina y 8-hidroxiquinolina y se evaluaron sus propiedades antitumorales sobre células de osteosarcoma humano en cultivo.

La síntesis de ambos complejos (figura 33), su caracterización y estabilidad fueron previamente reportadas por (Martín-Santos y col. 2013). Estos dos complejos fueron sintetizados y caracterizados fisicoquímicamente por el grupo de la Prof. Dra. Carmen Navarro Ranninger (Química Inorgánica, Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Madrid), quien bajo una colaboración científica los donó para la investigación de su acción biológica en osteoblastos tumorales en cultivo como parte de este trabajo de Tesis doctoral.

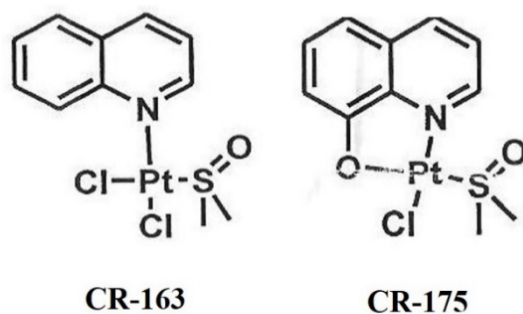


Figura 33 Estructuras químicas de los complejos de platino estudiados en esta tesis

3.3.1 Efectos de CR-163 y CR-175 sobre la viabilidad celular.

En la figura 34 se muestran los resultados obtenidos sobre la viabilidad celular en las células de osteosarcoma MG-63 mediante el ensayo de MTT.

Los resultados muestran que el complejo CR-175 es el más potente como inhibidor de la viabilidad celular mostrando un efecto deletéreo dependiente de la concentración a partir de los 5 μM , a diferencia de lo observado para el CR-163 donde los efectos citotóxicos comienzan a partir de 25 μM ($p < 0,01$). El compuesto CR-175 evidencia un efecto deletéreo muy pronunciado en el rango de concentraciones entre 5-25 μM donde genera una baja de aproximadamente el 80% de la viabilidad celular ($p < 0,01$). En comparación con esto el compuesto CR-163 solo genera una disminución de la viabilidad celular del 60% en el rango comprendido entre 50-100 μM . Para comprobar la efectividad y potencia antitumoral de los nuevos compuestos de platino testeados se utilizó como control de referencia una droga de platino de uso corriente en la clínica actual que es el *cis*-Pt. La figura 34 muestra los efectos del mismo sobre la línea celular MG-63 evidenciando un comportamiento similar al obtenido para el complejo CR-163, pero un menor efecto antitumoral que el observado para el CR-175.

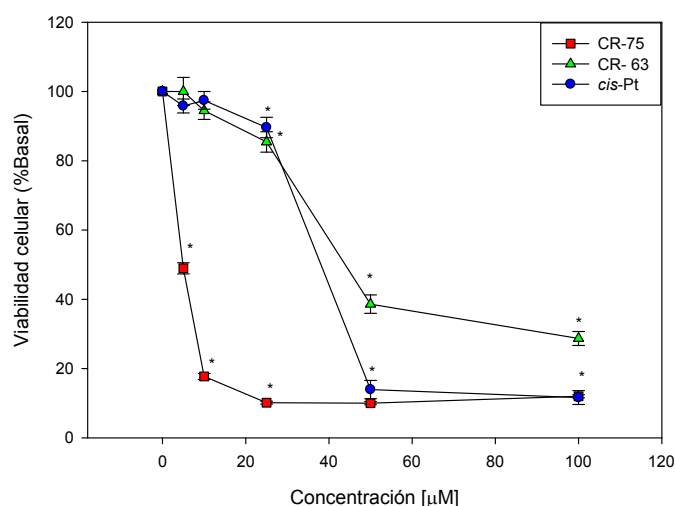


Figura 34 Efectos de los complejos (CR-163, CR-175) y el compuesto de referencia (*cis*-Pt) sobre la viabilidad celular de células de osteosarcoma MG-63. Los resultados están expresados como el porcentaje del Basal y representan la media \pm SEM ($n=16$) de 3 ensayos diferentes, * $p < 0,01$ significativo con respecto al Basal.

De los valores obtenidos para los IC₅₀ (tabla 2) se desprende claramente que el complejo CR-175 posee mayores efectos antitumorales que el *cis*-Pt lo cual nos indica que el mismo tendría una gran potencialidad para ser utilizado en terapias contra osteosarcoma.

Tabla 2 Valores de IC₅₀ obtenidos luego de 24 h de incubación para CR-163, CR-175 y *cis*-Pt.

Compuesto	IC ₅₀
CR-163	46 μ M
CR-175	4 μ M
<i>cis</i> -platino	39 μ M

En la figura 35 podemos observar los resultados de ambos compuestos sobre la viabilidad celular medida a través del colorante cristal violeta a 6 y 24 h. En concordancia con los resultados obtenidos para el ensayo de MTT vemos nuevamente que el complejo CR-175 posee efectos deletéreos mucho mayores tanto a 6 como a 24 h por sobre lo evidenciado por el CR-163. A 6 h el complejo CR-163 no altera la viabilidad celular en el rango testado (10-50 μ M) mientras que el CR-175 si produce una disminución de la misma llegándose a un valor de aproximadamente el 50% a 100 μ M ($p < 0,01$). Para el caso de 24 h observamos una disminución de la viabilidad celular por parte de CR-163 a 25 y 50 μ M llegándose a valores del 50% de viabilidad celular mientras que para CR-175 esos valores disminuyen al 20% de la supervivencia celular.

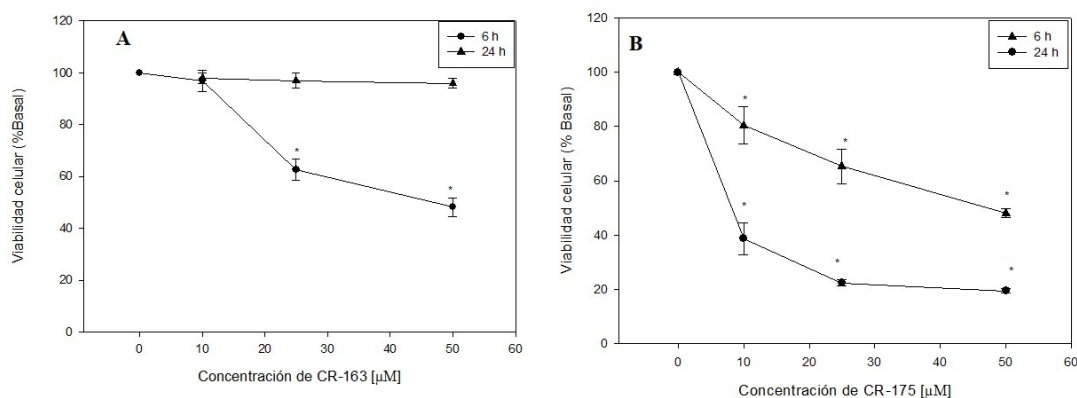


Figura 35 Efectos del complejo CR-163 (A) y CR-175 (B) sobre la viabilidad celular en la línea celular MG-63 luego de 6 y 24 h de incubación. Los resultados están expresados como el porcentaje del Basal y representan la media \pm SEM (n=16) de 3 ensayos diferentes, * $p < 0,01$, significativo con respecto al Basal.

3.3.2 Genotoxicidad

Debido a que las hidroxiquinolinas son inhibidoras de enzimas involucradas en la replicación del ADN y que esto está relacionado con su actividad anticancerígena, al igual que lo que ocurre con compuestos de platino como el *cis*-Pt que tienen como principal blanco de acción la molécula de ADN se realizó una evaluación de los efectos de ambos complejos sobre genotoxicidad. Este estudio se llevó a cabo a través de la técnica de electroforesis de una sola célula (ensayo cometa), la cual es ampliamente utilizada para el estudio del daño en el ADN. El ensayo cometa (SCGE) detecta simples y dobles cortes de cadenas de ADN, así como sitios sin bases y sitios donde ha ocurrido la excisión del mismo por reparación, bajo condiciones alcalinas (Collins y col. 1997) Como parámetro de estos daños se evaluó el *Tail Moment* el cual es definido como el largo de la cola x cantidad de ADN en la cola (Liao y col. 2009).

3.3.2.1. Detección de daño en el ADN a través del ensayo de cometa

El ensayo cometa fue realizado para dilucidar los efectos genotóxicos inducidos por los complejos de platino. Los ensayos fueron realizados a concentraciones pequeñas (1, 2.5, 5 μ M) donde la citotoxicidad es baja lo que nos permite visualizar los efectos genotóxicos. La figura 36 muestra que a 1 μ M el complejo CR-175 produce una mayor cantidad de cometas en las células MG-63 generando un incremento del *Tail Moment* por sobre el valor del control y del generado por el CR-163 ($p < 0,01$). Cuando aumentamos la concentración a 2,5 μ M observamos que esa relación se invierte debido a la mayor citotoxicidad generada por el compuesto CR-175 que comienza a enmascarar los efectos genotóxicos, mientras que el compuesto CR-163 incrementa el *Tail Moment* debido a que el nivel de citotoxicidad de ese compuesto a esa concentración no interfiere con la genotoxicidad. Para el caso de 5 μ M, observamos que los efectos citotóxicos interfieren en la determinación de la genotoxicidad para ambos complejos. Estos resultados demuestran que ambos complejos inducen daños en el ADN que incrementan los niveles de genotoxicidad destacándose una actividad mayor para el complejo CR-175.

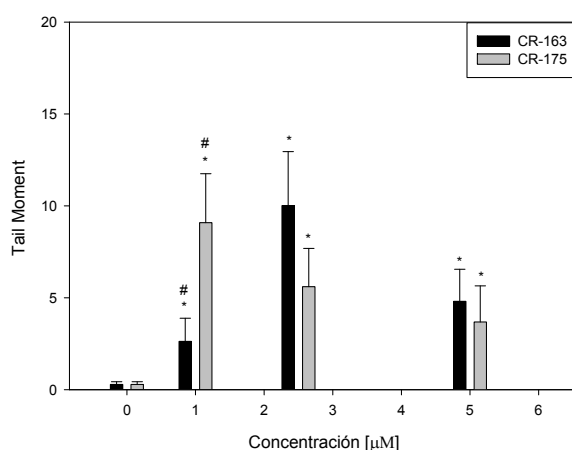


Figura 36 Efectos genotóxicos de ambos complejos de platino (CR-163 y CR-175) sobre la línea celular de osteosarcoma humano MG-63 determinado por la técnica de cometa (SCGE). El daño en el ADN fue evaluado calculando el *Tail Moment*. Luego de incubar por 24 h las células fueron lisadas y los fragmentos de ADN fueron procesados por electroforesis. Luego de esto los núcleos fueron tenidos y analizados. Los resultados están expresados como la media \pm SEM (n=150) de 3 ensayos diferentes, * ($p < 0,01$) significativo con respecto al Basal. Mecanismos de acción

3.3.3 Mecanismos de acción

Se investigaron los mecanismos de acción relacionados con los efectos de daño celular que podrían utilizar estos complejos de platino. Dentro de estos se determinaron los niveles de estrés oxidativo generados y la inducción de apoptosis para el complejo CR-175 que fue quien mostró mayor daño celular en los ensayos previamente reportados.

3.3.3.1. Estrés oxidativo

Uno de los principales mecanismos de muerte celular propuestos para las drogas quimioterapéuticas es la generación de especies reactivas de oxígeno. Es por esto que se estudió el efecto del complejo CR-175 sobre la producción de ROS utilizando la sonda fluorescente DHR 123.

Los resultados muestran que luego de 24 h de incubación con el complejo CR-175 se incrementaron los niveles de ROS de una manera dependiente de la concentración a partir de los 25 μM (figura 37). En la concentración más alta empleada (100 μM), el aumento de ROS fue de más del triple con respecto al basal, llegándose a un valor de 335% ($p < 0,01$). Estos resultados muestran que la generación de ROS podría ser uno de los mecanismos de acción relacionados con los efectos deletéreos para este compuesto pero que no es el único ya que a concentraciones más bajas (5 y 10 μM), donde vemos daño celular no observamos incrementos de ROS.

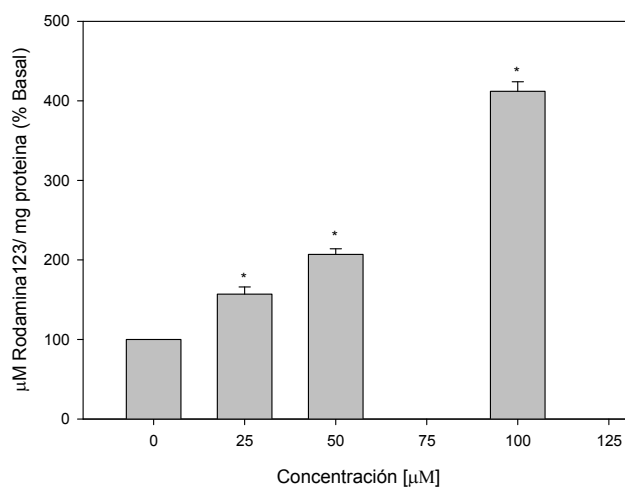


Figura 37 Generación de ROS en la línea celular MG-63 en presencia de CR-175. Las células fueron incubadas por 24 h a 37° C con concentraciones crecientes del complejo (5-100 μM). La producción de ROS de las células se midió mediante la oxidación de DHR123 a Rodamina123. Los valores representan la media \pm SEM, n=15, * $p < 0,01$ significativo respecto al control.

3.3.3.2 Apoptosis

3.3.3.2.1 Estudio de la externalización del residuo de Fosfatidilserina (PS) por annexina V

Para determinar cuáles son los mecanismos de muerte empleados por estos compuestos de platino se investigaron los efectos del CR-175 en la inducción de la apoptosis. La figura 38 muestra la gráfica correspondiente a la cuantificación de células apoptóticas incubadas con 10 y 50 μM del complejo por 6 h. Los resultados demuestran una inducción de los niveles de apoptosis tanto a 10 y 50 μM , en los cuales se observa un incremento de

la fracción de células anexina V(+)/ IP(-) de apoptosis temprana en el tratamiento realizado con 10 μ M. Para el tratamiento realizado con 100 μ M se ve un incremento de la fracción de células anexina V(+)/ IP(+) de 8% a 40% en comparación con el control, demostrando una tendencia de muerte dependiente de la concentración. Los resultados de apoptosis muestran una correlación directa con aquellos resultados encontrados sobre la viabilidad celular.

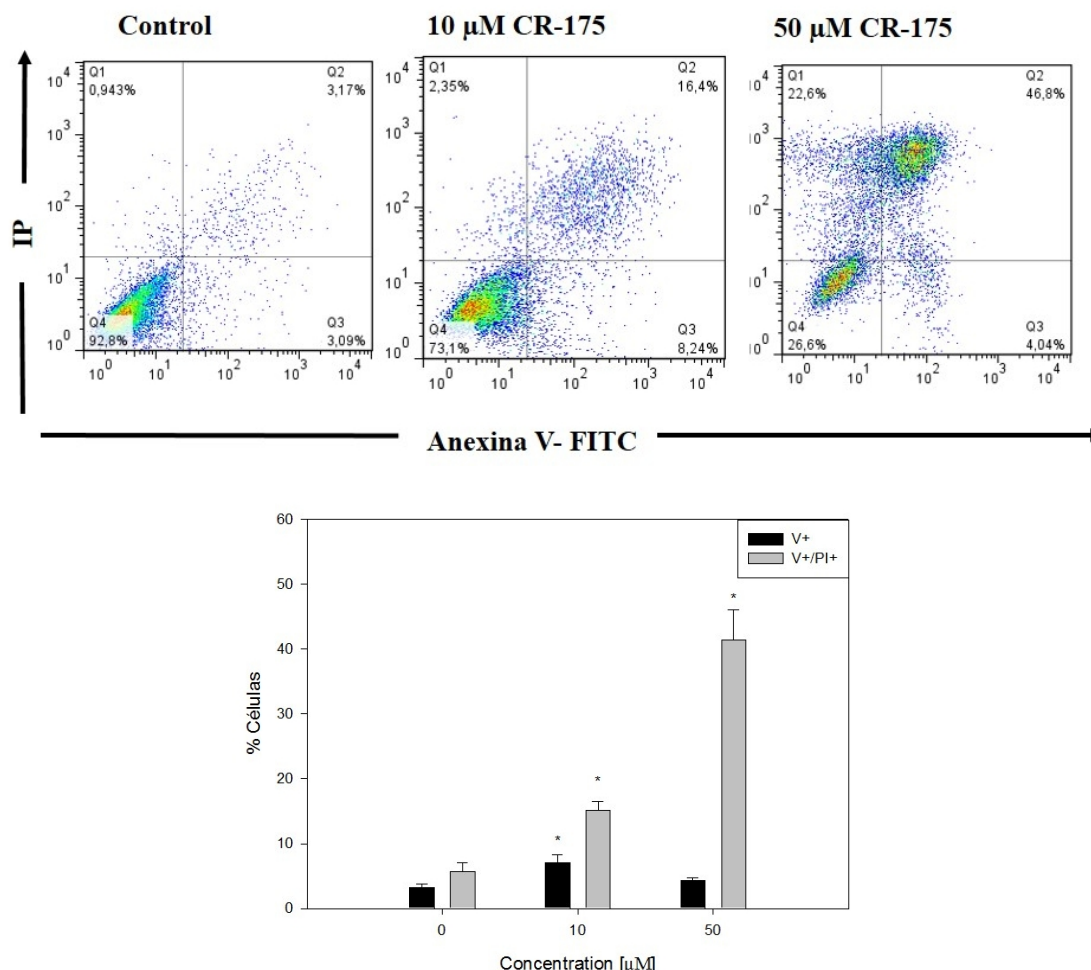


Figura 38 Efectos de CR-175 sobre la inducción de apoptosis. Las células MG-63 fueron incubadas durante 6 h con 10 y 50 μ M del compuesto y luego teñidas con anexina V/PI. A. Los plots son representativos de tres experimentos independientes B. Los resultados están expresados como la media \pm SEM (n=9) de 3 ensayos diferentes, *(p<0,01) significativo con respecto al Basal.

3.3.3.2.2 Estudio de la variación en el potencial de membrana mitocondrial

Las mitocondrias son una de las organelas más importantes involucradas en la regulación de la apoptosis. En ese contexto el potencial de membrana mitocondrial mantiene la integridad y la función de la mitocondria, por lo cual cualquier disipación del mismo envía las células a fenómenos de apoptosis o necrosis (Mayer y Oberbauer, 2003). Los resultados indican que el compuesto CR-175 disminuye el potencial de membrana mitocondrial de las células MG-63 cuando estas son incubadas con 50 μ M del complejo, observándose una disminución en el canal rojo y un incremento en el verde que reflejan un 12% de células apoptóticas en el control frente a un 28% de las células tratadas con el compuesto. Estos resultados reflejan la importancia de la disminución del potencial de membrana dentro de la apoptosis como principal mecanismo de muerte mediado por este tipo de complejos de platino.

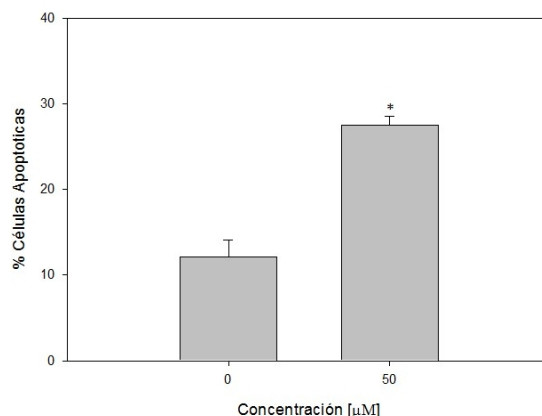


Figura 39 Efectos del complejo CR-175 sobre el potencial de membrana mitocondrial. Las células fueron incubadas con 50 μM del compuesto durante 6 h y después teñidas con JC1. Los resultados están expresados como la media ± SEM (n=9) de 3 ensayos diferentes, *(p<0,01) significativo con respecto al Basal.

3.3.3.3 Clivaje de ADN plasmídico (pA1)

Teniendo en cuenta que ciertos compuestos de platino como el *cis*-Pt tienen como principal blanco de acción la molécula de ADN y teniendo en cuenta que algunos compuestos inorgánicos poseen actividad de clivaje del ADN se realizó una evaluación de los efectos de ambos complejos de platino sobre la actividad nucleasa en un modelo plasmídico pA1. La actividad nucleasa del complejo CR-175 resultó ser más activa que el de CR-163. La figura 40 muestra la aparición del fragmento lineal del pA1 luego del tratamiento en presencia de CR-175 y oxona (agente oxidante), demostrando una mayor actividad nucleasa por parte del complejo CR-175 por sobre el CR-163 en las condiciones oxidantes testeadas (calle 6 vs calle 10). Cabe destacar que la droga de referencia *cis*-Pt no ejerció actividad de clivaje sobre el plásmido pA1.

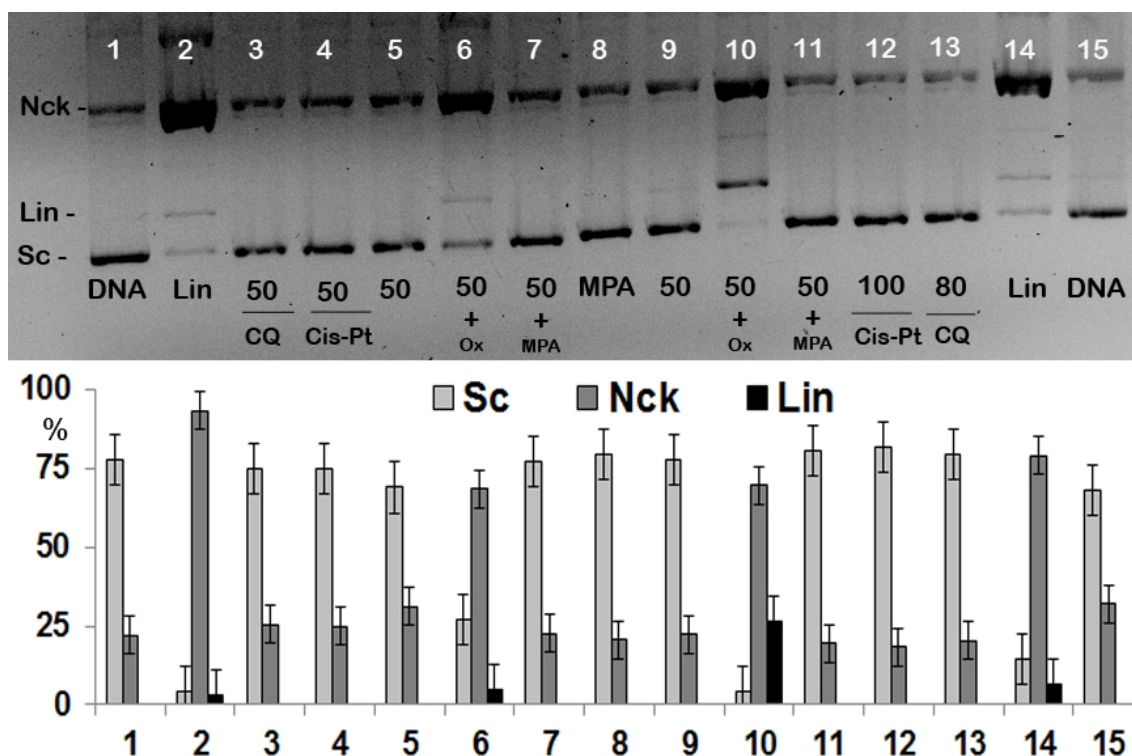


Figura 40 Actividad de clivaje del ADN plasmídico utilizando como modelo el plásmido pA1 por parte del ligando clioquinol (CQ calle 3 y 14), cis-platino (calle 4 y 13), CR-163 (5-7), CR-175 (10-12) en 10 mM de PBS. Se utilizaron oxona y MPA para simular condiciones oxidantes y reductoras, respectivamente. La actividad nucleasa fue calculada y semi-cuantificada utilizando el *software* ImageJ.

3.4 Vanadio

3.4.1 Vanadio (V): Complejos de oxovanadio(V) con hidroxilamido-aminoácidos, con metionina [VO(NH₂O)₂(met)] y con valina [VO(NH₂O)₂(val)].

La hidroxilamina H₂NOH es un ligando quelante fuerte que es capaz de unirse al vanadio. Además, los aminoácidos elegidos poseen múltiples acciones biológicas *per se* y se espera que tengan una acción diferencial en cada uno de los complejos sintetizados. La síntesis y caracterización espectroscópica de los complejos [VO(NH₂O)₂(aa)] donde aa₁=Metionina y aa₂=Valina, (figura 41) fue previamente reportada por (Piro y col. 2009). Estos dos complejos fueron sintetizados por el Lic. Gabriel Arrambide en el grupo de Química Inorgánica de la Universidad de la Republica (Uruguay) dirigido por la Dra. Dinorah Gambino, quienes gentilmente lo donaron para la investigación exhaustiva de su acción biológica en osteoblastos en cultivo como parte de este trabajo de Tesis doctoral. Para la evaluación de su acción antitumoral se utilizaron las células osteoblasticas murinas de fenotipo normal MC3T3-E1 y la de osteosarcoma de rata UMR106.

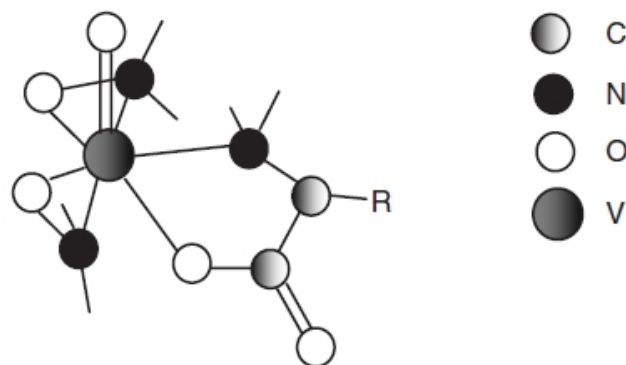


Figura 41 Representación esquemática de la estructura de los complejos $[\text{VO}(\text{H}_2\text{NO})_2(\text{aa})]$

3.4.1.1 Estudios de viabilidad celular

3.4.1.1.1 Ensayo del Cristal violeta

En la figura 42 se muestran los resultados obtenidos para ambos complejos en las células osteoblásticas de fenotipo normal MC3T3-E1 (A) y la de osteosarcoma de rata UMR106 (B).

Los resultados mostraron que el complejo $[\text{VO}(\text{NH}_2\text{O})_2(\text{met})]$ es el más potente como inhibidor de la viabilidad celular mostrando un efecto antiproliferativo dependiente de la concentración a partir de los 2,5 y 5 μM para las MC3T3-E1 y UMR106, respectivamente. El complejo con metionina generó un efecto dosis respuesta entre 2,5-10 μM en las MC3T3-E1 y entre 5-100 μM en las UMR106, observándose un mayor efecto deletéreo sobre la línea de fenotipo normal que en la tumoral. Por otro lado, el complejo $[\text{VO}(\text{NH}_2\text{O})_2(\text{val})]$ mostró menores efectos deletéreos en ambas líneas celulares pero nuevamente observándose un mayor efecto inhibitorio sobre las células de fenotipo normal por sobre las de fenotipo tumoral. Las mayores diferencias las encontramos en el rango de concentración de 2,5 a 50 μM ($p < 0,01$).

Estos resultados no son favorables debido a que muestran que los osteoblastos de fenotipo normal son más sensibles que los tumorales en todo el rango de concentración testado para ambos complejos.

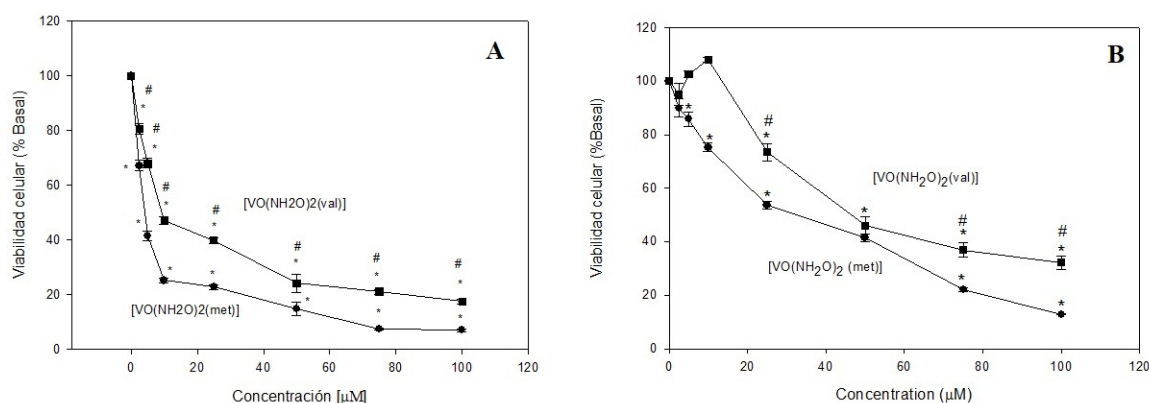


Figura 42 Efectos de los complejos $[\text{VO}(\text{NH}_2\text{O})_2(\text{met})]$ y $[\text{VO}(\text{NH}_2\text{O})_2(\text{val})]$ sobre la viabilidad celular de células MC3T3-E1 (A) Y UMR106 (B). . Los resultados están expresados como la media \pm SEM ($n=16$) de 3 ensayos diferentes, * ($p < 0,01$) significativo con respecto al Basal.

3.4.1.1.2 Efectos de $[\text{VO}(\text{NH}_2\text{O})_2(\text{met})]$ y $[\text{VO}(\text{NH}_2\text{O})_2(\text{val})]$ sobre la actividad mitocondrial.

Con el fin de profundizar los estudios de viabilidad celular se decidió estudiar el efecto de ambos metalocompuestos sobre la actividad mitocondrial.

En la figura 43 se observó el efecto de ambos complejos sobre la viabilidad mitocondrial determinada por el ensayo de MTT.

En esta se observó un efecto inhibitorio mayor por parte de ambos complejos a concentraciones bajas (2,5-25 μM) en la línea MC3T3-E1 por sobre la UMR106 ($p < 0,01$). Nuevamente observamos un mayor efecto citotóxico por parte del complejo de vanadio(V) con metionina por sobre el compuesto con valina en ambas líneas celulares. Estos resultados son congruentes y muestran un efecto similar al observado anteriormente en el ensayo de cristal violeta, demostrando un efecto negativo de ambos complejos en la selectividad por parte de la línea de fenotipo normal por sobre la tumoral.

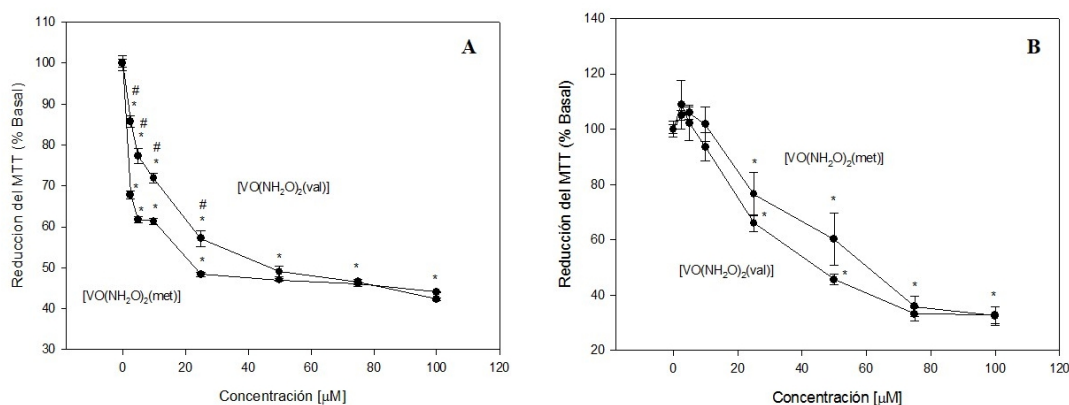


Figura 43 Efectos de los complejos $[\text{VO}(\text{NH}_2\text{O})_2(\text{met})]$ y $[\text{VO}(\text{NH}_2\text{O})_2(\text{val})]$ sobre la reducción de la sal de MTT en células MC3T3-E1 (A) Y UMR106 (B). Los resultados están expresados como la media \pm SEM (n=16) de 3 ensayos diferentes, * ($p < 0,01$) significativo con respecto al Basal.

3.4.1.2 Cambios morfológicos

3.4.1.2.1 Tinción con Giemsa

Tomando en cuenta los efectos deletéreos de ambos complejos, se investigó la acción de estos sobre la morfología de las células MC3T3-E1 y UMR106.

En condiciones basales, las células MC3T3-E1 poseen morfología tipo fibroblástica, su núcleo es redondo con alrededor de 3-5 nucléolos. Las células están unidas mediante conexiones celulares y pueden observarse algunas mitosis. Cuando se incubaron con 50 μM de $[\text{VO}(\text{NH}_2\text{O})_2(\text{met})]$ aparecieron alteraciones morfológicas típicas de apoptosis y necrosis y se generó una gran disminución del número de células por campo.

En presencia de 50 μM $[\text{VO}(\text{NH}_2\text{O})_2(\text{val})]$, se observaron efectos similares pero con una disminución de la cantidad de células por campo de menor proporción, mostrando el mayor efecto deletéreo del complejo con metionina en la línea de fenotipo normal.

La línea celular UMR106, en aspectos generales, tienen un fenotipo transformado, característico de las células tumorales, con el núcleo excéntrico y de forma arriñonada. Con respecto a la línea MC3T3-E1, los osteoblastos tumorales poseen una mayor relación núcleo/citoplasma. En presencia de 50 μM $[\text{VO}(\text{NH}_2\text{O})_2(\text{met})]$, puede observarse

condensación citoplasmática y cuerpos apoptóticos mientras cuando incubamos con $[\text{VO}(\text{NH}_2\text{O})_2(\text{val})]$ los núcleos se alargaron con forma de herradura.

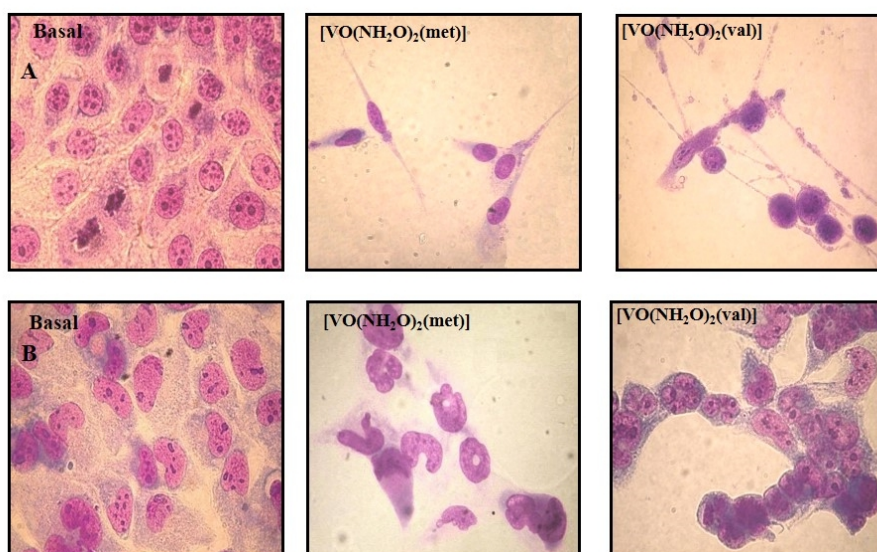


Figura 44 Efectos en los cambios morfológicos inducidos por $[\text{VO}(\text{NH}_2\text{O})_2(\text{met})]$ y $[\text{VO}(\text{NH}_2\text{O})_2(\text{val})]$ sobre células MC3T3-E1 (Panel superior A) y UMR106 (Panel inferior B). Las células fueron incubadas durante 24 h en ausencia (control) y con $50 \mu\text{M}$ de $[\text{VO}(\text{NH}_2\text{O})_2(\text{met})]$ y $[\text{VO}(\text{NH}_2\text{O})_2(\text{val})]$ para luego ser fijadas y tenidas con Giemsa. Aumento 400 X

3.4.1.3 Genotoxicidad

Luego de la evaluación de los efectos sobre la viabilidad celular por parte de ambos metalofármacos, se decidió investigar la acción del complejo $[\text{VO}(\text{NH}_2\text{O})_2(\text{val})]$ sobre la genotoxicidad (ensayo cometa e inducción de micronúcleos). El ensayo cometa lo hemos descrito anteriormente en la descripción de resultados que corresponden a los complejos de platino. Para el caso de los micronúcleos, estos son cuerpos citoplasmáticos que poseen una porción de un cromosoma acéntrico o todo el cromosoma que no se segregó correctamente durante la anafase, resultando en la pérdida de todo o una parte del cromosoma que es lo que observamos como un pequeño tercer núcleo (Stopper y Muller, 1997).

La elección del complejo con valina fue realizada debido a que este generó un menor efecto citotóxico sobre la línea de fenotipo normal y porque posee mayor estabilidad en sólido y en solución.

3.4.1.3.1 Detección de micronúcleos

Los efectos producidos por el complejo $[\text{VO}(\text{NH}_2\text{O})_2(\text{val})]$ en la inducción de micronúcleos se observan en la figura 45. En esta podemos ver que el compuesto indujo la formación de micronúcleos en la línea MC3T3-E1 desde $2.5 \mu\text{M}$ con una respuesta dependiente de la dosis. Debemos destacar que los efectos genotóxicos no fueron determinados a concentraciones mayores a $25 \mu\text{M}$ debido a los fuertes efectos citotóxicos generados por el complejo en la línea de osteoblastos no transformados. Por otro lado, para las células de osteosarcoma de rata UMR106 se observó que los efectos comienzan a partir de $5 \mu\text{M}$ pero sin mostrar un efecto dosis-respuesta. La bleomicina ($1 \mu\text{g}/\text{mL}$) fue

usada como control positivo y observamos que a la concentración más alta testada del complejo se observa la misma inducción de micronúcleos ($p < 0,01$).

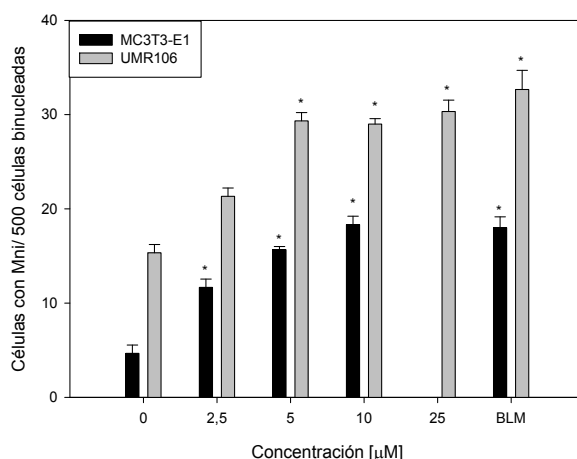


Figura 45 Inducción de micronúcleos en células MG-63. Las células fueron incubadas durante 24 h con el complejo $[\text{VO}(\text{NH}_2\text{O})_2(\text{val})]$. Los resultados están expresados como la media \pm SEM ($n=500$) de 3 ensayos diferentes, $*(p < 0,01)$ significativo con respecto al Basal. La bleomicina (BLM) fue utilizada como control positivo.

3.4.1.3.2. Detección de daño en el ADN a través del ensayo de cometa

El ensayo cometa fue realizado para dilucidar los efectos genotóxicos de los distintos complejos de vanadio. Como parámetro de estos daños se evaluó el valor de *Tail Moment* el cual es definido como el largo de la cola del cometa formado \times cantidad de ADN en la cola.

La figura 46 muestra que el complejo $[\text{VO}(\text{NH}_2\text{O})_2(\text{val})]$ generó la formación de cometa en las células MC3T3-E1 de 2,5 a 25 μM evidenciando el daño generado sobre el ADN por este compuesto. La disminución del daño producido sobre el ADN a medida que aumentamos la concentración de complejo es probablemente debido al nivel de citotoxicidad generado a esas concentraciones. Además, el incremento en el *Tail moment* por parte del complejo desde 2.5 a 10 μM es mayor que el generado por el pulso de 2 h de agua oxigenada (2mM) utilizada como control positivo. Por otro lado, en las células tumorales (UMR106) no se observa inducción de cometas en el rango de concentraciones testado (2.5-25 μM), demostrando que no hay efectos genotóxicos ejercidos por el complejo sobre estas células.

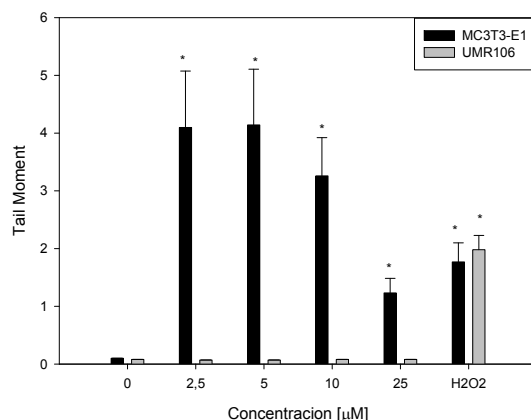


Figura 46 Inducción de daño en el ADN de células MC3T3-E1 y UMR106 por parte de $[\text{VO}(\text{NH}_2\text{O})_2(\text{val})]$ por el método de cometa. El daño en el ADN fue evaluado a través del *Tail Moment*. Luego de 24 h de incubación con el complejo las células fueron lisadas y los fragmentos de ADN fueron corridos en electroforesis, para posteriormente ser tenidos y analizados. Los resultados están expresados como la media \pm SEM ($n=150$) de 3 ensayos diferentes, $*(p<0,01)$ significativo con respecto al control.

3.4.1.4 Mecanismos de acción

Como posible mecanismo de acción involucrado en los efectos inhibitorios ejercidos por ambos complejos, se estudió y determinó el estrés oxidativo generado a través de la medición de los niveles de especies de oxígeno reactivas (ROS)

3.4.1.4.1. Estrés oxidativo: Generación de especies reactivas del oxígeno (ROS)

Uno de los principales mecanismos de citotoxicidad propuestos para el vanadio y sus derivados es la generación de estrés oxidativo (Evangelou, 2002). En este marco, se estudió el efecto de ambos complejos de vanadio sobre la producción de ROS. Los resultados muestran que el complejo $[\text{VO}(\text{NH}_2\text{O})_2(\text{met})]$, incrementó los niveles de ROS de una manera dependiente de la dosis en ambas líneas celulares, llegando a un valor de 218% y 157% a 100 μM para las MC3T3-E1 y UMR106, respectivamente (figura 47). Para el caso del complejo $[\text{VO}(\text{NH}_2\text{O})_2(\text{val})]$, se observó un incremento significativo del nivel de ROS en ambas líneas celulares, teniendo valores de 228% y de 160% para las células de fenotipo normal y tumoral ($p<0,01$).

Estos resultados se correlacionan con los observados en los ensayos de viabilidad celular y citotoxicidad en los cuales se observó una mayor actividad para ambos complejos sobre la línea de fenotipo normal por sobre la de fenotipo tumoral. Los mismos avalan la idea de que la generación de ROS podría ser uno de los mecanismos de acción relacionados con los efectos antitumorales de los complejos de vanadio en estudio.

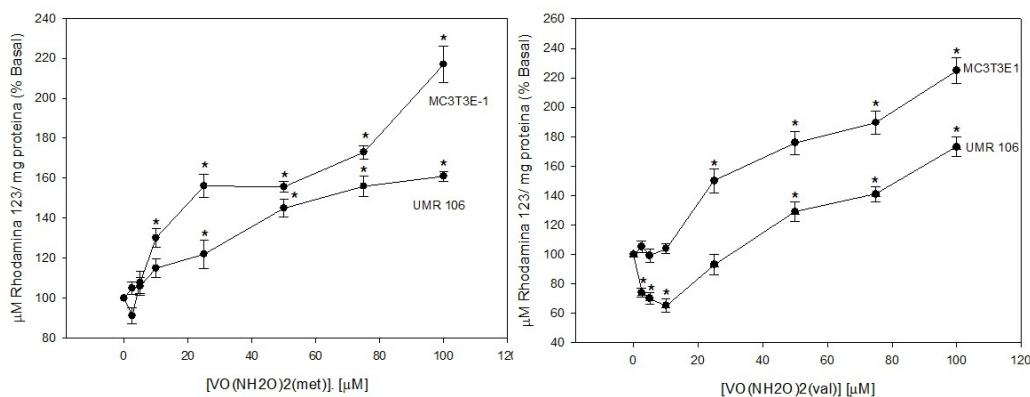


Figura 47 Efectos de los complejos [VO(NH₂O)₂(met)] y [VO(NH₂O)₂(val)] sobre la generación de ROS en la línea celular MG-63. Las células fueron incubadas por 24 h a 37° C con concentraciones crecientes de los complejos (10-100 μM). La producción de ROS de las células se midió mediante la oxidación de DHR123 a Rodamina123. Los valores representan la media ± SEM, n=15, * p<0,01 significativo respecto al control.

Debido a que los resultados obtenidos para todos los ensayos realizados mostraron un mayor efecto de ambos complejos sobre la línea normal de osteoblastos murinos por sobre la tumoral, sumado a la poca estabilidad en sólido de ambos complejos, se decidió no continuar con los estudios en otras líneas celulares como la de osteosarcoma humano MG-63, dándole prioridad a el desarrollo de pruebas para otros complejos con posibles acciones diferenciales.

3.4.2 Vanadio (IV)

3.4.2.1 Complejos del catión vanadilo (IV) con oxodiacetato (oda), VO(oda), con oxodiacetato(oda) y 2,2 bipyridina (bipy), VO(oda)bipy y con oxodiacetato(oda) y fenantrolina(phen), VO(oda)phen.

Dentro de la familia de los ligandos multidentados, el oxodiacetato se presenta como un versátil agente de complejación de metales. También, la 2,2 bipyridina es un potente ligando que contiene capacidad para complejarse dando lugar a quelatos que resulten más fáciles de captar y de transportar hacia el interior de la célula. De la misma manera, la 1,10 o-fenantrolina es un ligando bidentado que posee potente acción intercalante del ADN per se y que forma quelatos con diversos metales.

La síntesis del complejo de oxodiacetato (oda), con el catión vanadilo, así como la determinación de su estructura por difracción de rayos-X (figura 48) fue previamente reportado (Del Río y col. 2000). Además, estos mismos autores en otro trabajo reportaron la síntesis del complejo con oxodiacetato (oda) y 2,2 bipyridina (bipy), con el catión vanadilo (Del Río y col. 2003). Por otro lado, la síntesis y estructura del complejo con oxodiacetato (oda) y fenantrolina (phen) fue previamente reportada por Alvarez y col. en el año 2010. Posteriormente estos tres complejos fueron sintetizados y caracterizados fisicoquímicamente por el Prof. Dr. E. J. Baran (Grupo de Bioinorganica, CEQUINOR), quien gentilmente los donó para la investigación exhaustiva de su acción biológica en osteoblastos en cultivo como parte de este trabajo de Tesis doctoral.

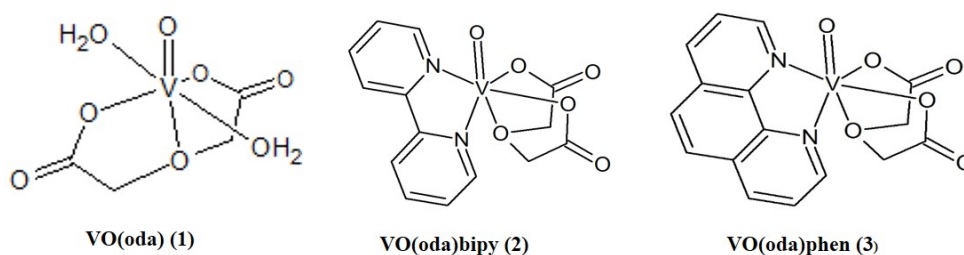


Figura 48 Estructuras propuestas para la familia de complejos de vanadio con los ligandos oxodiacetato, 2,2 bipiridina, y fenantrolina.

3.4.2.1.1 Estudios de viabilidad celular

3.4.2.1.1.1 Ensayo del Cristal violeta

En la figura 49 se muestran los resultados obtenidos para las células de osteosarcoma MG-63 mediante el ensayo de cristal violeta luego de incubar las células con concentraciones de VO(oda), VO(oda)bipy, VO(oda)phen en el rango 2,5-100 μM durante 24 h.

Los estudios realizados en la línea MG-63 de osteosarcoma humano evidenciaron que el complejo VO(oda)phen es el más potente como inhibidor de la viabilidad celular mostrando un efecto antiproliferativo dependiente de la concentración a partir de los 5 μM . Luego de 24 h de incubación y con una concentración de 100 μM de este compuesto la viabilidad celular fue de un 37% ($p < 0,01$). Por otro lado, VO(oda) y VO(oda)bipy solo generaron efectos inhibitorios a partir de 50 μM , observándose una viabilidad celular de 84 y 69% a 100 μM , respectivamente.

Los ensayos realizados en las líneas MC3T3-E1 (osteoblastos murinos de fenotipo normal) y UMR106 (osteosarcoma de rata) mostraron que hasta 10 μM no hubo ningún efecto sobre la viabilidad de las líneas MC3T3-E1 y UMR106, pero a partir de 25 μM , pudo observarse un efecto inhibitorio dependiente de la dosis ($p < 0,01$) para el caso del VO(oda). Para el caso del VO(oda)bipy solo se observaron efectos inhibitorios en ambas líneas celulares a partir de 50 μM ($p < 0,01$). Por el contrario, los resultados observados para el VO(oda)phen muestran que este complejo es altamente deletéreo tanto para las células de fenotipo normal como tumoral desde 2.5 μM y con efecto dependiente de la concentración de 2,5 hasta 50 μM ($p < 0,01$).

Es importante destacar que los osteoblastos normales son más sensibles a los complejos VO(oda) y VO(oda)phen que los tumorales en todo el rango de concentración testeado, mientras que para el caso de VO(oda)bipy se observa un efecto contrario teniendo este un efecto selectivo por las células de osteosarcoma de rata que por sobre las demás.

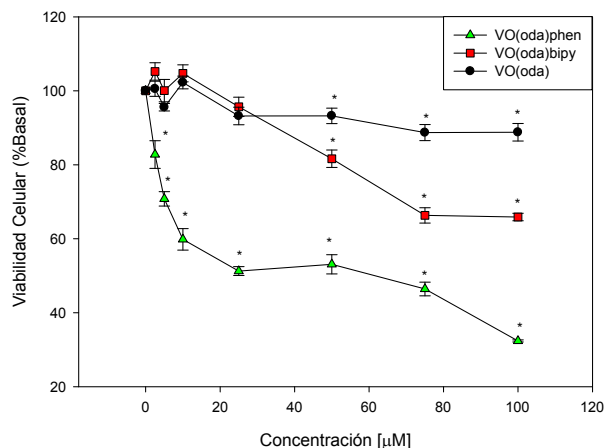


Figura 49 Efecto de los complejos de vanadio con oxodiacetato, 2,2 bipyridilo y fenantrolina sobre la viabilidad celular de células de osteosarcoma M6-63. Los resultados están expresados como el porcentaje del Basal y representan la media \pm SEM de 3 ensayos diferentes (n=16), *significativo con respecto al Basal.

3.4.2.1.1.2 Actividad lisosomal y mitocondrial.

Los lisosomas de células metabólicamente activas presentan la capacidad de captar el colorante rojo neutro (RN), siendo éste un ensayo usualmente empleado para determinar la citotoxicidad de diversos compuestos. Por otro lado, es ampliamente conocido que aquellas células metabólicamente activas deben presentar actividad mitocondrial y que dicha actividad está relacionada con su viabilidad.

La acción de un compuesto tóxico como la de los complejos de vanadio en las células de osteosarcoma humano MG-63 afecta, entre otras, la actividad lisosomal, provocando una disminución de la capacidad lisosomal para captar colorantes. Este efecto puede ser observado en la figura 50. Como puede verse, el complejo VO(oda)phen generó una pérdida significativa de la captación del colorante por los lisosomas a partir de 10 μ M mostrando una tendencia dosis respuesta. Para el caso de los complejos VO(oda) y VO(oda)bipy solo se observó la presencia de daños citotóxicos a partir de los 50 μ M obteniéndose valores de daño mucho menores que los observados para el complejo con fenantrolina.

Resultados similares fueron observados para el ensayo de actividad mitocondrial, en el cual se demostró nuevamente que la potencia antitumoral sigue el siguiente patrón: VO(oda) \leq VO(oda)bipy < VO(oda)phen.

Estos resultados de captación de RN y actividad mitocondrial se correlacionan adecuadamente con los observados en el ensayo del cristal violeta ya que en los tres ensayos observamos mayores efectos deletéreos del complejo VO(oda)phen por sobre los otros dos en la línea de osteosarcoma humano MG-63.

La alteración de la actividad lisosomal y mitocondrial pueden ser uno de los factores que juegan un rol preponderante en la citotoxicidad de estos tres compuestos de vanadio testeados.

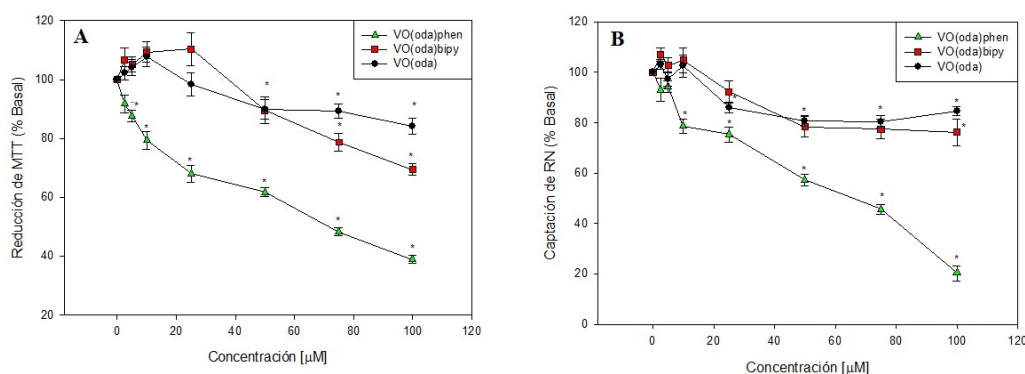


Figura 50 Reducción del MTT(A) y captación de rojo neutro (B) por células de osteosarcoma humano en cultivo luego de 24 h de incubación con VO(oda), VO(oda)bipy, VO(oda)phen. Los resultados están expresados como la media \pm SEM, n=16 , *p<0.01

3.4.2.1.2 Cambios morfológicos

3.4.2.1.2.1 Tinción con Giemsa

Tomando en cuenta los efectos deletéreos de los tres complejos, se investigó la acción de estos sobre la morfología de las células MG-63. En la figura 51 se muestran los resultados obtenidos. En condiciones básicas, las células MG-63 poseen morfología tipo fibroblástica, su núcleo es de forma ovalada con alrededor de 3-5 nucléolos. Las células están unidas mediante múltiples conexiones celulares y pueden observarse algunas mitosis. Cuando se incubaron con 10 μ M de VO(oda), se observó una pequeña disminución del número de células por campo y una reducción del citoplasma, sin observarse cambios en el núcleo. Mientras que cuando se incubaron con 25 y 50 μ M de VO(oda) vimos un marcado decrecimiento del número de células por campo y pronunciadas alteraciones tanto a nivel citoplasma como del núcleo. Resultados similares fueron observados cuando las células fueron tratadas con VO(oda)bipy pero con mayores efectos observados en las concentraciones más altas testeadas. Por otro lado, VO(oda)phen produce una alteración en las características morfológicas de las células MG-63 mucho mayor que la producida por los otros complejos, observándose a 10 μ M la presencia de células apoptóticas con el núcleo fragmentado. Además, a altas concentraciones observamos un decrecimiento muy grande del número de células por campo así como de cambios morfológicos.

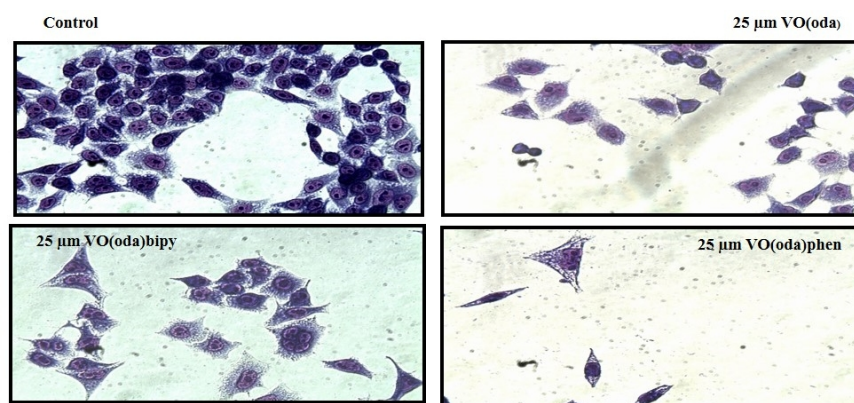


Figura 51 Efecto del VO(oda), VO(oda)bipy, VO(oda)phen sobre la morfología de las células MG-63. Las células fueron incubadas en ausencia (control) y con 25 μ M de cada compuesto por 24h. Posteriormente fueron fijadas y teñidas con Giemsa y observadas bajo microscopio óptico invertido. Aumento 400 X.

3.4.2.1.3 Genotoxicidad

Luego de la evaluación de los efectos citotóxicos por parte de los tres complejos de vanadio en la línea de osteosarcoma humano MG-63, se investigó la acción de los mismos sobre la genotoxicidad a través de la técnica de electroforesis de una sola célula (ensayo cometa), la cual es ampliamente utilizada para el estudio del daño en el ADN.

3.4.2.1.3.1 Detección de daño en el ADN a través del ensayo de cometa

El ensayo cometa fue realizado para dilucidar los efectos genotóxicos de los distintos complejos de vanadio. Como parámetro de estos daños se evaluó el *Tail Moment*. Los ensayos fueron realizados a concentraciones bajas (2.5-10 μM) donde la citotoxicidad es baja para poder visualizar los efectos genotóxicos y que no se produzca un enmascaramiento de los mismos.

Los resultados indicaron que no se producen cometas en las células MG-63 tratadas con el complejo VO(oda) en el rango de concentraciones testeado. Sin embargo, VO(oda)phen indujo daño en el ADN de esas células desde 2,5 a 10 μM , en el cual observamos a 5 y 10 μM un incremento del *Tail Moment* mayor que el generado por la bleomicina (control positivo). Por otro lado, VO(oda)bipy solo generó genotoxicidad en la concentración más alta estudiada (10 μM), pero el valor del *Tail Moment* observado es mucho menor que el evidenciado por el complejo con fenantrolina. Estos resultados en su conjunto ponen de manifiesto el mayor poder genotóxico por parte del complejo con fenantrolina VO(oda)phen por sobre sus pares VO(oda)bipy y VO(oda).

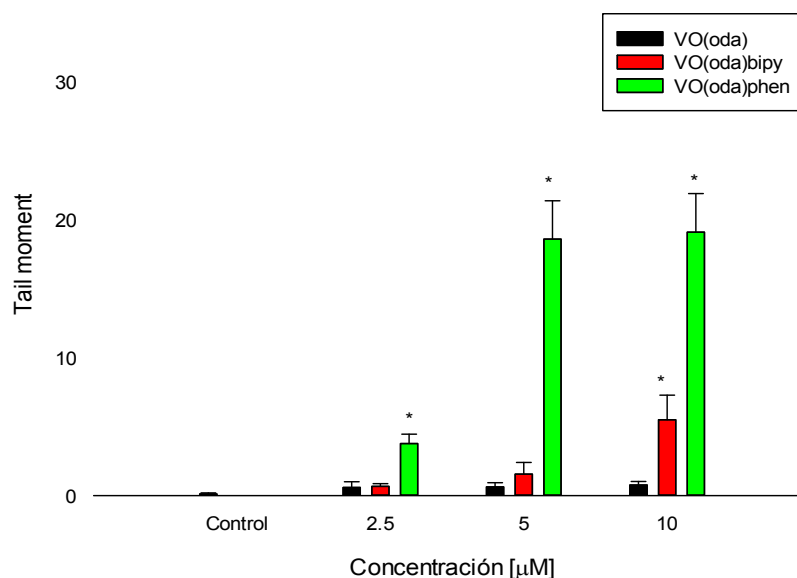


Figura 52 Inducción de daño en el ADN de células MG-63 por parte de VO(oda), VO(oda)bipy, VO(oda)phen utilizando el método de cometa. El daño en el ADN fue evaluado a través del Tail Moment. Luego de 24 h de incubación con los complejos, las células fueron lisadas y los fragmentos de ADN fueron corridos en electroforesis, para posteriormente ser tenidos y analizados. Los resultados están expresados como la media \pm SEM (n=150) de 3 ensayos diferentes, *(p<0,01) significativo con respecto al control.

3.4.2.1.4 Mecanismos de acción

Se investigaron los posibles mecanismos de acción involucrados en los efectos citotóxicos utilizados por los complejos. Así se determinó el estrés oxidativo a través de la medición de los niveles de especies de oxígeno reactivas (ROS) y de la evaluación de los efectos del complejo sobre la inducción de apoptosis. Finalmente, también se investigó la interacción de estos sobre un modelo de ADN plasmídico (pA1) y su correlación con la actividad genotóxica observada en las células, así como la relación existente entre la generación de ROS y la interacción con el ADN.

3.4.2.1.4.1 Estrés oxidativo: Generación de especies reactivas del oxígeno (ROS)

Los resultados mostraron que el complejo VO(oda)phen, incrementó los niveles de ROS de una manera dependiente de la dosis a partir de los 10 μM (figura 53). En la concentración más alta empleada (100 μM), el aumento de ROS fue de más del triple con respecto al basal, llegándose a un valor de 335% ($p < 0,01$). Por el contrario, solo a 100 μM de VO(oda) y VO(oda)bipy observamos un incremento en los niveles de ROS con valores de 157 y 202% respectivamente ($p < 0,01$). Estos resultados se correlacionan con los observados en los ensayos de viabilidad celular y citotoxicidad en los cuales se ve un mayor efecto por parte del complejo de vanadio con fenantrolina, demostrando que la generación de ROS podría ser uno de los mecanismos de acción relacionados con los efectos antitumorales de los complejos de vanadio en estudio.

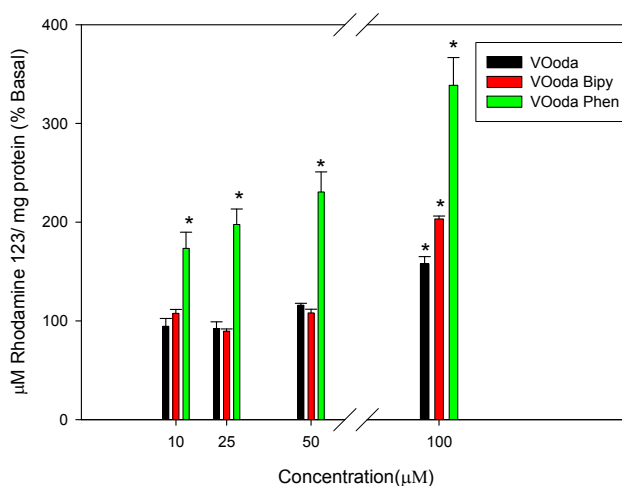


Figura 53 Generación de ROS en células MG-63 en presencia de VO(oda), VO(oda)bipy, VO(oda)phen. Las células fueron incubadas por 24 h a 37° C con concentraciones crecientes del complejo (10, 25, 50 y 100 μM). La producción de ROS de las células se midió mediante la oxidación de DHR123 a Rodamina123. Los valores representan la media \pm SEM, $n=15$, * $p < 0,01$ significativo respecto al control.

3.4.2.1.4.2 Apoptosis: Estudio de la externalización del residuo de Fosfatidilserina (PS) por anexina V

La apoptosis es un proceso fisiológico de muerte celular potenciado por la presencia de agentes injuriantes. Este proceso genera, principalmente a nivel de membranas, diversas modificaciones en la estructura de las células. Una de las primeras modificaciones que pueden ser definidas es la externalización del fosfolípido fosfatidilserina a la cara externa de la membrana plasmática, considerándose esta una medida de las etapas tempranas de la apoptosis. Las figuras 54 y 55 muestran la cuantificación de células apoptóticas determinadas por citometría de flujo en MG-63 incubadas con 100 μM de cada uno de los complejos por 12 y 24 h. A las 12 h no se observaron modificaciones en los porcentajes de células apoptóticas para ninguna de las condiciones probadas. Sin embargo, a 24 h estos mostraron que el complejo VO(oda)phen generó una inducción del 38% de células apoptóticas frente a un 21% generado por el VO(oda)bipy ($p < 0,01$). Por el contrario, el complejo VO(oda) generó un 8 % de células apoptóticas las cuales no son estadísticamente significativas frente a las condiciones basales (sin adición del complejo). Estos resultados demuestran el mayor efecto antitumoral observado por parte del complejo VO(oda)phen por sobre el VO(oda)bipy y VO(oda) evidenciando a la apoptosis como un posible mecanismo de acción involucrado en la toxicidad de estos complejos de vanadio. Los resultados de apoptosis muestran una correlación directa con aquellos resultados observados en los ensayos de viabilidad celular, citotoxicidad y generación de ROS.

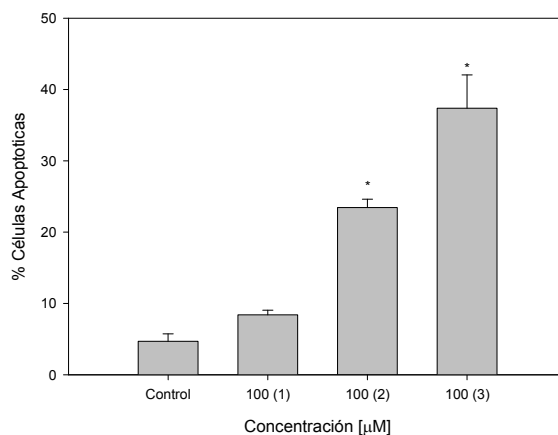


Figura 54 Efectos de VO(oda), VO(oda)bipy, VO(oda)phen en la inducción de apoptosis en células MG-63. Las células fueron incubadas por 24 h con 100 μM de cada complejo y luego fueron teñidas con anexina V-IP. En el panel superior, los valores representan la media \pm SEM, $n=9$, * $p < 0,01$ significativo respecto al control. En el panel inferior observamos los histogramas correspondientes que son representativos de 3 experimentos independientes

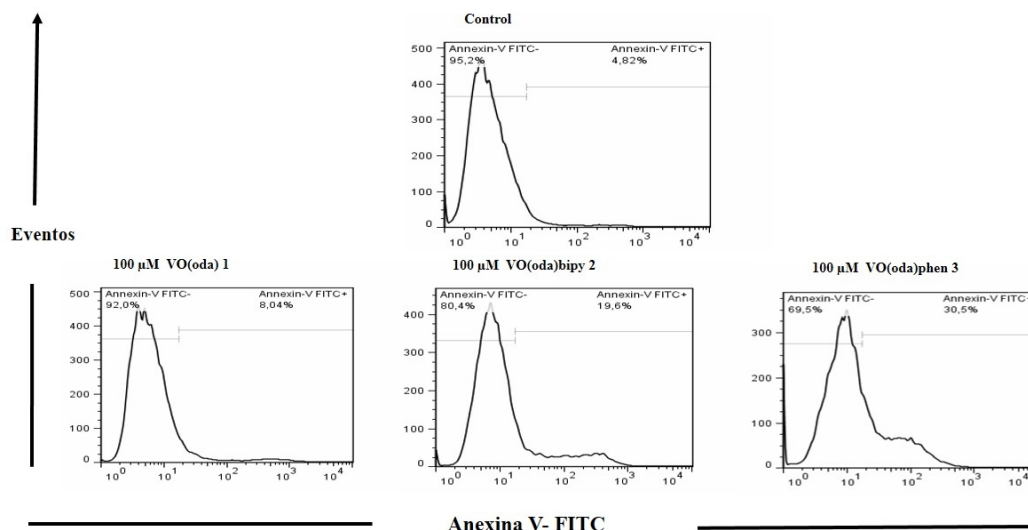


Figura 55 Efectos de VO(oda), VO(oda)bipy, VO(oda)phen en la inducción de apoptosis en células MG-63. Las células fueron incubadas por 24 h con 100 μ M de cada complejo y luego fueron teñidas con anexina V-IP . En el panel superior, los valores representan la media \pm SEM, n=9, * p<0,01 significativo respecto al control. En el panel inferior observamos los histogramas correspondientes que son representativos de 3 experimentos independientes

3.4.2.1.4.3 Clivaje de ADN plasmídico (pA1)

Se ha demostrado que algunos compuestos inorgánicos poseen actividad de clivaje del ADN y por eso han sido denominados “nucleasas inorgánicas”. La implicancia de estos compuestos se debe a que los mismos pueden ser utilizados como probables agentes quimioterapéuticos debido a su interacción con el ADN (Butenko y col. 2009).

El estudio de la actividad nucleasa consiste en determinar la capacidad que tienen las sustancias para escindir la cadena helicoidal de ADN.

Con el fin de estudiar los posibles efectos de clivaje del plásmido pA1 de ADN, la actividad nucleasa de los tres complejos fue testada en dos buffers distintos: buffer fosfato y MOPS, debido a que dicha actividad depende entre otras cosas de la naturaleza del buffer utilizado.

La actividad nucleasa del VO(oda) y VO(oda)bipy resultó similar en todo el rango de concentración testado (5-100 μ M), generando el fragmento lineal a partir de los 50 μ M. También se observó que la actividad de ambos es ligeramente mayor en el buffer fosfato por sobre el MOPS. Por otro lado, los resultados mostraron que el VO(oda)phen fragmentó eficientemente el ADN incluyendo la linealización de este, a partir de los 5 μ M y demostrando tener la mayor actividad nucleasa de los tres complejos testados.

La actividad nucleasa fue calculada y cuantificada en buffer fosfato a través de la pendiente de la recta del gráfico Ln (% ADN Superenrollado) vs Concentración (Figura 56) en el cual se usó el compuesto VO(acac)₂ como control positivo. Los resultados evidenciaron que el orden de potencia de actividad nucleasa esta dado por:

VO(oda)phen [0.1426 \pm 0.0498] > VO(oda)bipy [0.0174 \pm 0.0025] > VO(oda) [0.0185 \pm 0.0043].

Para el caso del VO(acac)₂ ese valor fue de 0.0313 \pm 0.0808, demostrando que el control positivo utilizado tiene una actividad nucleasa menor que el complejo VO(oda)phen.

Los valores de la tabla muestran la disminución del ADN superenrollado con el aumento de las concentraciones de los complejos, en el cual se observa claramente la mayor actividad nucleasa observada para el compuesto de vanadio con fenantrolina.

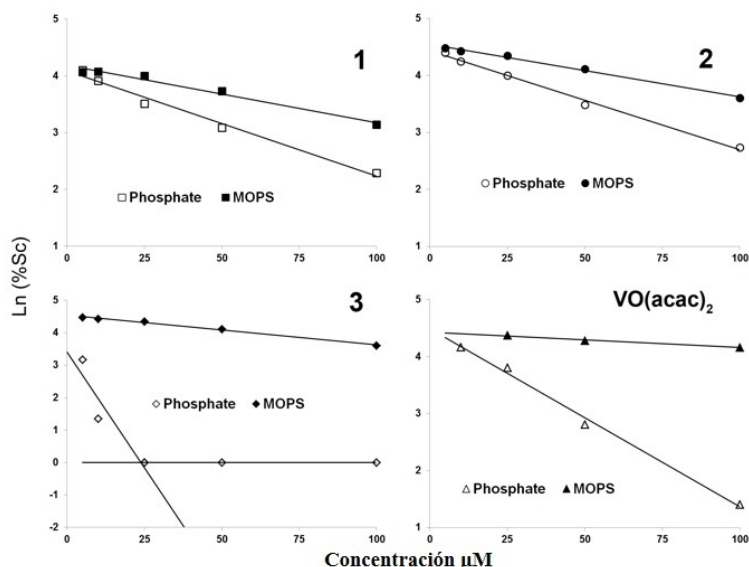


Figura 56 Actividad de clivaje del ADN plasmídico utilizando como modelo el plásmido pA1 por parte de VO(oda) (1) , VO(oda)bipy (2), VO(oda)phen (3) en buffer fosfato y MOPS . La actividad nucleasa fue calculada y cuantificada a través de la pendiente de la recta del gráfico.

Tabla 3 Valores de el $\ln(\%Sc)$ correspondientes a 5, 50 y 100 μM en buffer fosfato

Concentracion, μM	VO(oda), 1	VO(oda)bipy, 2	VO(oda)phen, 3	VO(acac) ₂
5	4.10539375	4.398332819	3.168843082	-
50	3.09065839	3.485153297	0	2.80844483
100	2.2987529	2.733249271	0	1.40516047

Con el fin de investigar detalladamente la relación existente entre los efectos antiproliferativos de los complejos de vanadio así como de su interacción con el ADN plasmídico y la posible generación de ROS, el clivaje por parte de los 3 complejos fue testeado en presencia de diferentes *scavengers* de ROS como NaN_3 , NaBz y DMSO, y de H_2O_2 .

La figura 57 muestra que el VO(oda)bipy generó la linealización del ADN plasmídico a 100 μM en buffer fosfato, mientras que ese efecto fue inhibido por la adición de los *scavengers* en la misma manera. Este resultado demostró que la interacción del complejo con el ADN plasmídico estaría mediado por la generación de ROS debido a que cuando el ensayo se plantea con la presencia de diferentes *scavengers* el compuesto no generó la linealización del ADN. Por otro lado, cuando al ensayo se le adiciona H_2O_2 se observó un incremento en el porcentaje de la forma lineal del plásmido demostrando que uno de los intermediarios claves en tal interacción es la generación de ROS. Cabe destacar que resultados similares se encontraron para el VO(oda) y que ninguno de los ligandos testeados (oxodiacetato, 2,2 bipyridina y fenantrolina) tienen efecto sobre el clivaje del ADN por si solos.

Para el caso del VO(oda)phen los resultados fueron muy diferentes ya que solo con el NaN_3 se observó un pequeño recupero en el clivaje del ADN, mientras que con DMSO y NaBz los resultados fueron similares a el control con el complejo solo. Además, se observó un efecto sinérgico entre el complejo y el H_2O_2 en el clivaje del ADN sugiriendo que la generación de ROS es uno de los mecanismos por los cuales se genera el daño en

el ADN. Este resultado es congruente con lo observado en el ensayo de generación de ROS celular en el cual el complejo VO(oda)phen generó mucha mayor cantidad de ROS que sus pares VO(oda) y VO(oda)bipy, y es por esto que los *scavengers* no pudieron recuperar la función debido a que el nivel de ROS generado fue muy grande y eso se tradujo en un clivaje del ADN mucho mayor, observándose rápidamente la forma lineal. Estos resultados también coinciden con lo observado en el ensayo de genotoxicidad en el cual el VO(oda)phen fue el más activo probablemente por la acción intercalante que posee *per se* la fenantrolina.

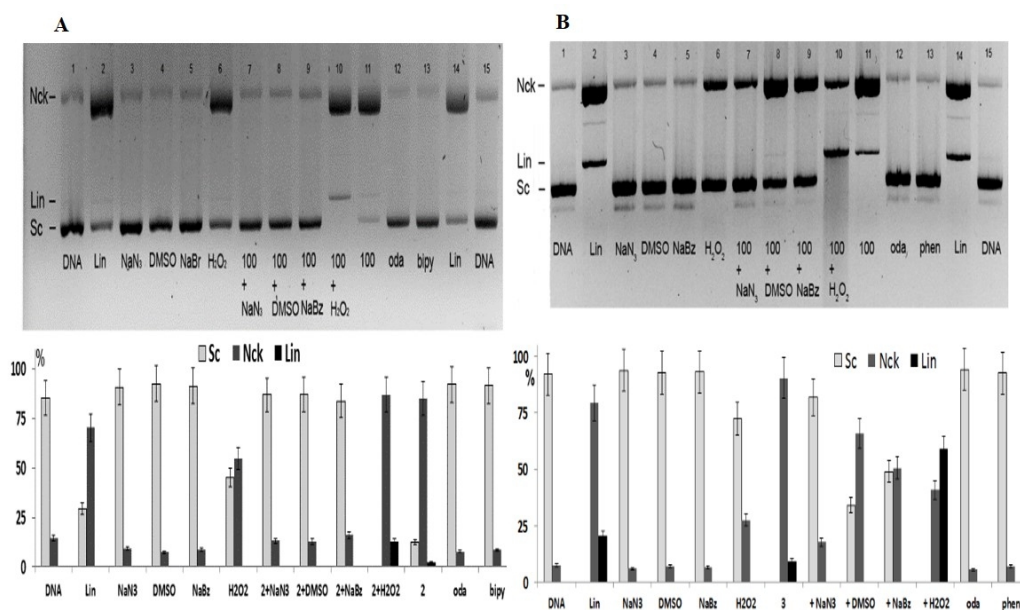


Figura 57 A) Efectos de los *scavengers* y H₂O₂ sobre la actividad nucleasa de VO(oda)bipy (2) a 100 μM en buffer fosfato. Los *scavengers* utilizados fueron ‘NaN₃’, ‘NaBz’, ‘DMSO’ y como agente inductor de ROS el ‘H₂O₂’. B.) Efectos de los *scavengers* y H₂O₂ sobre la actividad nucleasa de VO(oda)phen (3) a 100 μM en buffer fosfato. Los *scavengers* utilizados fueron ‘NaN₃’, ‘NaBz’, ‘DMSO’ y y como agente inductor de ROS el ‘H₂O₂’.

3.4.2.2 Complejos de oxovanadio(IV) con los flavonoides crisina y silibinina: [VO(crisina)₂EtOH]₂ (VOcris) y Na₂[VO(silibinina)₂].6H₂O (VOsil)

La síntesis y caracterización fisicoquímica de ambos complejos de oxovanadio(IV) con los flavonoides crisina y silibinina (figura 58) fue previamente reportado por (Naso y col. 2010, 2011). En estos trabajos los autores reportaron tanto la síntesis como la caracterización fisicoquímica de ambos metalofármacos. En un principio estos complejos fueron sintetizados por la Dra. Luciana G. Naso del grupo de Complejos del CEQUINOR y cedidos de forma gentil para el estudio de sus propiedades biológicas enmarcadas dentro de esta tesis. Posteriormente estos dos complejos fueron sintetizados por el Lic. Ignacio León bajo la supervisión de la Dra. Luciana G. Naso para la posterior investigación exhaustiva de su acción biológica en sistemas *in vitro* (células en cultivo) e *in vivo* (ratones nude xenotransplantados) como parte de este trabajo de Tesis doctoral.

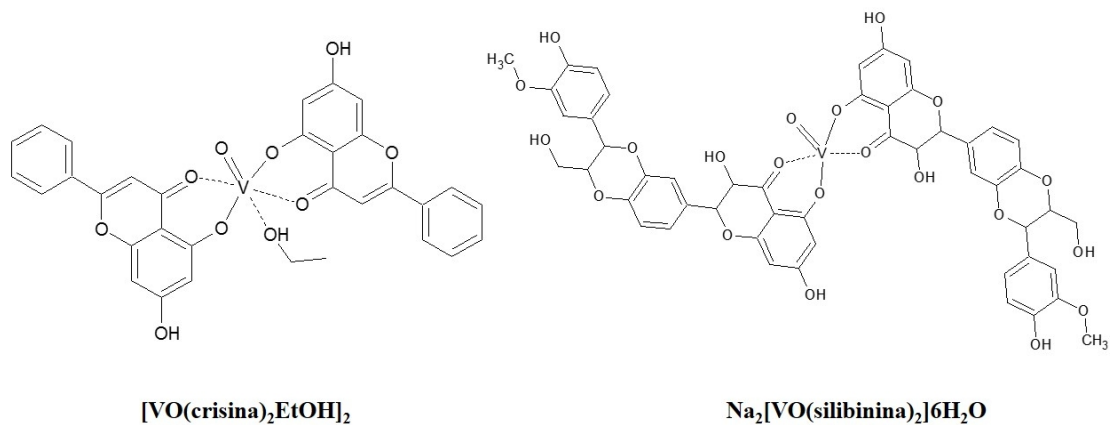


Figura 58 Estructura probables de los complejos $[VO(crisina)_2EtOH]_2$ y $Na_2[VO(silibinina)_2] \cdot 6H_2O$.

Estudios realizados en la línea celular de Osteosarcoma humano (MG-63)

3.4.2.2.1 Estudios de viabilidad celular

3.4.2.2.1.1 Ensayo del cristal violeta

Los resultados de la figura 59 nos muestran el efecto de la complejación del metal con el ligando sobre la actividad de los mismos en la viabilidad celular.

En la figura 59A se observa que el efecto inhibitorio del complejo $[VO(crisina)_2EtOH]_2$ es mucho mayor que el del ligando libre (crisina) y el de oxovanadio(IV), en el cual el complejo resultó deletéreo en concentraciones que van desde los 10-100 μM llegando a valores de 25% de viables ($p < 0,01$). Por otro lado, la crisina generó un efecto antiproliferativo menor que el del complejo, generando un % 55 de viables a 100 μM , mientras que el catión vanadilo solo ejerció un mínimo efecto inhibitorio a 100 μM ($p < 0,01$). Además, en la Figura 59B se muestra el efecto de inhibición de la viabilidad celular por parte del complejo $Na_2[VO(silibinina)_2] \cdot 6H_2O$, la silibinina y el catión vanadilo. Los resultados indicaron que VOsil provoca un disminución en la viabilidad celular desde 25 a 100 μM , al igual que la silibinina libre ($p < 0,01$). En este caso observamos nuevamente el mayor efecto antiproliferativo generado por parte del complejo por sobre el ligando y el metal libre en todo el rango de concentraciones, salvo a 100 μM donde el complejo y el ligando generan un efecto inhibitorio similar ($p < 0,01$). Estos resultados demostraron claramente el efecto beneficioso de la complejación del metal con el ligando, el cual potencia sus propiedades deletéreas sobre las células MG-63.

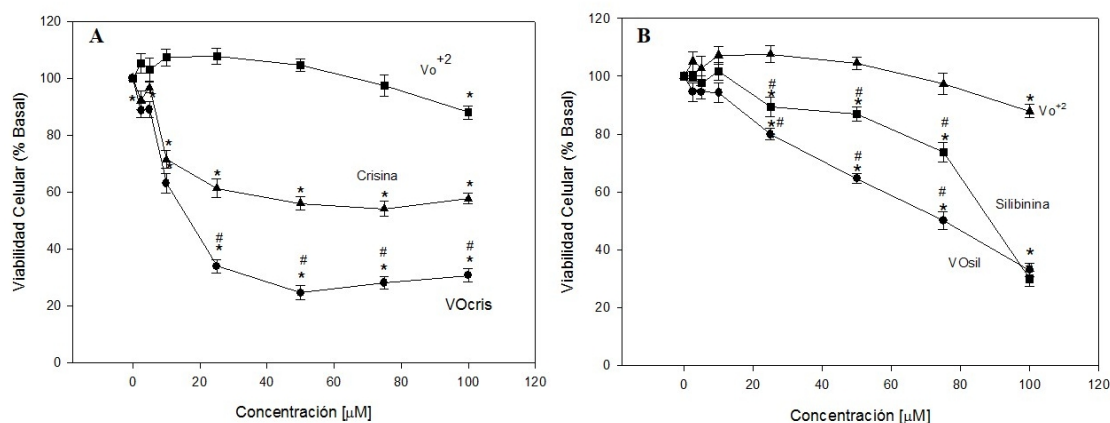


Figura 59 A. Efecto del catión vanadilo, el flavonoide crisina y el complejo VOcris sobre la viabilidad celular de células MG-63. B. Efecto del catión vanadilo, el flavonoide silibinina y el complejo VOsil sobre la viabilidad celular de células MG-63. Los resultados están expresados como el porcentaje del Basal y representan la media \pm SEM de 3 ensayos diferentes (n=16), * (p<0,01) significativo con respecto al Basal. # (p<0,01) significativo entre concentraciones testeadas.

Tabla 4 Valores de IC₅₀ para la viabilidad celular en células MG-63 expuestas por 24 h.

	VOcris	Crisina	VOsil	Silibinina	V(IV)O ²⁺
IC ₅₀	16	>100	74	89	>100

Los valores de la tabla demuestran que el complejo VOcris tiene el valor de IC₅₀ más bajo por lo cual es el más activo y deletéreo en la línea celular de osteosarcoma humano MG-63.

3.4.2.2.1.1 Comparación de los efectos antiproliferativos en líneas celulares osteoblásticas

La figura 60 muestra la comparación de los efectos sobre la viabilidad celular del complejo VOcris y VOsil en la línea MC3T3-E1 (osteoblastos de fenotipo normal), UMR106 (osteosarcoma de rata) y MG-63 (osteosarcoma humano). En esta se observa un efecto deletéreo mayor en las células tumorales por sobre las de fenotipo normal para el VOcris siguiendo un orden de potencia antitumoral: MC3T3-E1 < UMR106 < MG-63. Estos resultados indican que el complejo VOcris es un excelente candidato para la evaluación exhaustiva de sus mecanismos de acción en la línea tumoral debido a la especificidad y la acción selectiva que demostramos anteriormente

La misma figura muestra que se realizó un análisis similar para los efectos observados con el complejo VOsil en las mismas tres líneas celulares, evidenciándose en menor manera, pero al igual que para el complejo VOcris, un mayor efecto inhibitorio del complejo sobre las líneas celulares tumorales por sobre la línea MC3T3-E1 de osteoblastos de fenotipo normal. Para este caso, la potencia antitumoral sigue el siguiente orden MC3T3-E1 < MG-63 < UMR106. Los resultados en las líneas MC3T3-E1 y UMR106 tanto para VOcris como para VOsil fueron previamente reportados por (Naso y col. 2010, 2011).

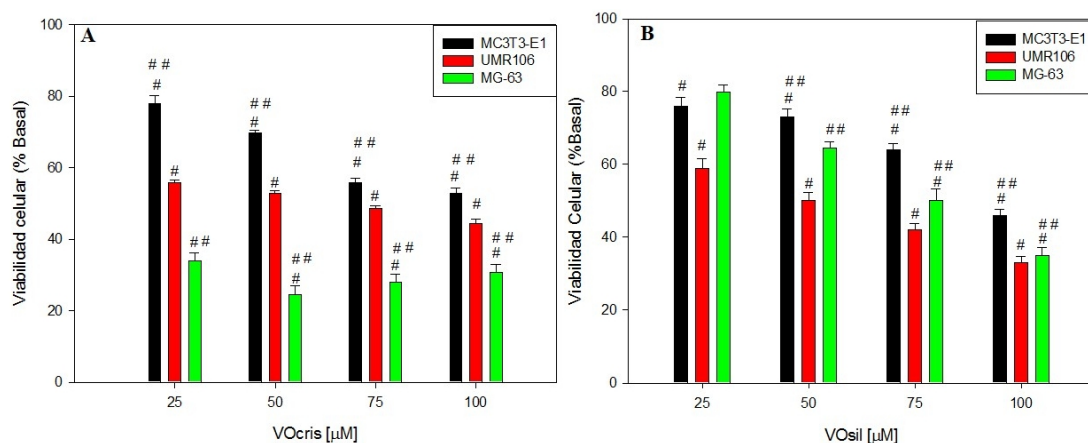


Figura 60 Efectos de los complejos VOcris (A) y VOsil (B) sobre la viabilidad celular evaluada por el método de cristal violeta sobre células MC3T3-E1, UMR106 y MG-63. Los resultados están expresados como el porcentaje del Basal y representan la media \pm SEM de 3 ensayos diferentes (n=16), # (p<0,01) significativo entre concentraciones testeadas para las líneas celulares MC3T3-E1, UMR106. ## (p<0,01) significativo entre concentraciones testeadas para las líneas celulares MC3T3-E1 y MG-63.

3.4.2.2.1.2 Efectos de VOcris y VOsil sobre la actividad lisosomal y mitocondrial.

Basándose en los resultados del ensayo de cristal violeta y en vistas de profundizar los conocimientos de la acción antiproliferativa de ambos complejos, se decidió estudiar la citotoxicidad en dos organelas de vital importancia como son los lisosomas y la mitocondria.

La figura 61A muestra el efecto de ambos complejos sobre los lisosomas. Como puede observarse, el complejo VOcris generó una pérdida significativa de la captación del rojo neutro por los lisosomas a partir de 5 μ M mientras que el VOsil lo hace a partir de 25 μ M. Para este último observamos un efecto dosis respuesta llegándose a valores de captación del 31% a 100 μ M, mientras que para el primero se llega a un valor del 18% a esa misma concentración (p<0,01).

Por otro lado, en la figura 61B se observó el efecto generado por VOcris y VOsil sobre la mitocondria, evaluado por el ensayo de MTT. En esta observamos una tendencia similar a la mostrada para la citotoxicidad en lisosomas. El complejo con crisina mostró efectos más deletéreos que el con silibinina, generando daños en la viabilidad que llegan aproximadamente al 20 % de células supervivientes en concentraciones que van desde 25 a 100 μ M (p<0,01). Por otro lado, VOsil genera daños citotóxicos con efectos dosis respuesta a partir de 25 μ M.

Estos resultados en conjunto mostraron un mayor efecto citotóxico de VOcris por sobre VOsil en todo el rango de concentraciones probado, confirmando los resultados observados en el ensayo de cristal violeta.

La interacción de los complejos con el lisosoma y la mitocondria podría ser uno de los factores que juegan un rol preponderante en la citotoxicidad generada por estos.

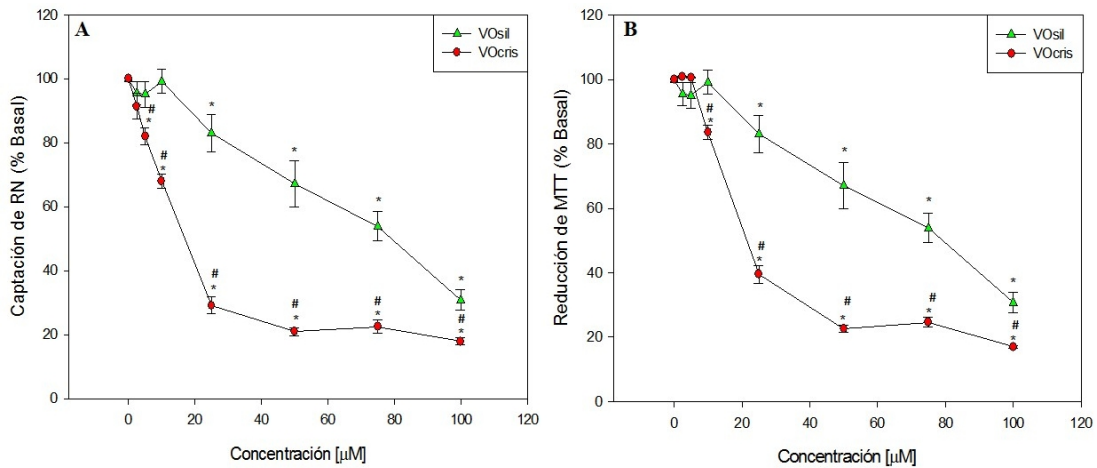


Figura 61 Captación de rojo neutro (A) y Reducción del MTT (B) por células de osteosarcoma humano en cultivo luego de 24 h de incubación con VOcris y VOsil. Los resultados están expresados como la media \pm SEM, n=16 de 3 ensayos diferentes, *(p<0.01) significativo con respecto al basal, # (p<0,01) significativo entre concentraciones testeadas para VOcris y VOsil.

Por otro lado, con el fin de evaluar y comparar el real efecto antitumoral de ambos complejos de vanadio en la línea celular de osteosarcoma humano (MG-63) se testeó el efecto de un quimioterapéutico comercial ampliamente utilizado para el tratamiento de diversos tipos de tumores como es el *cis*-Pt. Los resultados de la citotoxicidad evaluados por el método del MTT se muestran en la figura 62. En esta se observó que para las concentraciones más bajas (10 y 25 µM) el complejo de vanadio con crisina muestra una marcada diferencia en su acción antitumoral con respecto al *cis*-Pt, el cual no tiene efecto antiproliferativo a esas concentraciones. Para concentraciones más altas que van de 50-100 µM los efectos del *cis*-Pt son más drásticos que a bajas concentraciones obteniéndose valores de 15% de viabilidad celular del orden de las obtenidas para el complejo VOcris. Estos resultados son de una importancia muy grande ya que colocarían a las nuevas drogas de vanadio con flavonoides como una probable alternativa de terapia antitumoral a los quimioterapéuticos comerciales como el *cis*-Pt.

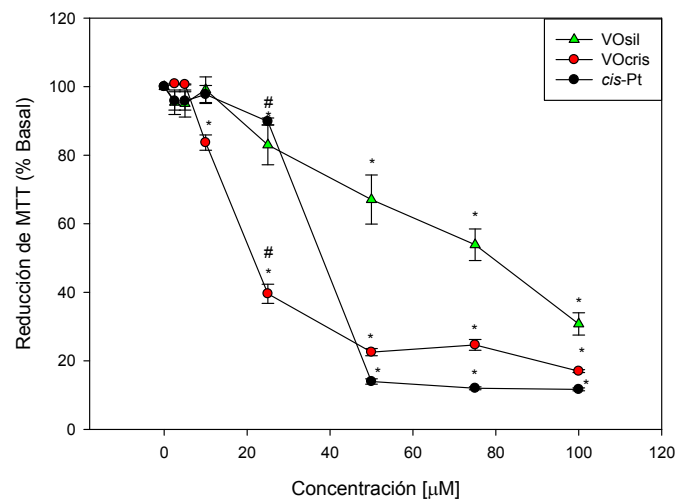


Figura 62 Efectos de los complejos VOsil, VOcris y *cis*-Pt sobre la viabilidad celular en células MG-63 medida a través de la reducción de la sal de MTT. Los resultados están expresados como la media \pm SEM, (n=16) de 3 ensayos diferentes, *(p<0.01) significativo con respecto al basal, # (p<0,01) significativo entre concentraciones testeadas.

3.4.2.2.1.1 Estudios realizados en células mononucleares de sangre periférica humana.

Con el objetivo de testear los efectos citotóxicos de los complejos de vanadio con flavonoides en un modelo celular de fenotipo normal así como se hizo con la línea celular MC3T3-E1, nos propusimos probar su acción en un modelo de cultivo primario de células mononucleares derivada de sangre periférica humana. Este ensayo tiene una relevancia clínica y farmacológica muy importante ya que nos permite evaluar la acción de nuestras drogas antitumorales en un sistema de fenotipo normal sin ningún tipo de transformación y comparar los efectos obtenidos en las líneas celulares continuas. Los resultados observados en la figura 63 nos demuestran que para 50 y 100 μM del complejo con crisina no se observan efectos significativamente estadísticos con respecto al control ($p < 0,01$), mientras que para el complejo con silibinina observamos un mínimo efecto solo a 100 μM donde la viabilidad celular disminuye en un 15% por sobre lo ocurrido en el control ($p < 0,01$). Estos resultados son muy importantes ya que vemos que para las concentraciones testeadas los efectos citotóxicos sobre los linfocitos son casi nulos en comparación con lo ocurrido en todas las líneas tumorales testeadas en las cuales encontramos efectos deletéreos.

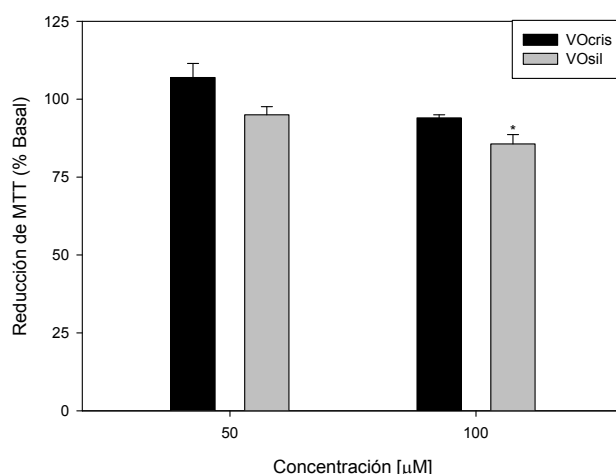


Figura 63 Efectos de los complejos VOsil y VOcris sobre la viabilidad celular en linfocitos de sangre periférica humana medida a través de la reducción de la sal de MTT. Los resultados están expresados como la media \pm SEM, (n=9) de 3 ensayos independientes, *($p < 0,01$) significativo con respecto al basal.

3.4.2.2.2 Cambios morfológicos: tinción con sondas fluorescentes

Los efectos generados por ambos complejos sobre la morfología de las células de osteosarcoma humano MG-63 fueron investigados por microscopia confocal. Se realizaron las correspondientes tinciones del citoesqueleto y del núcleo con faloidina e yoduro de propidio para visualizar dichos cambios. Los resultados obtenidos indicaron que en condiciones basales, las células MG-63 no sufrieron ningún tipo de alteración nuclear ni citoplasmática. Cuando estas fueron incubadas con 25 μM de VOcris, se observó una disminución en el número de células por campo y una deformación tanto del citoesqueleto como del núcleo, demostrando así el efecto deletéreo de este compuesto por esta línea celular. Por otro lado, cuando incubamos con 25 μM de VOsil vemos un marcado daño tanto sobre la zona nuclear como la citoplasmática pero la disminución de células por campo fue menor que la obtenida con el complejo de vanadio y crisina. Estos

resultados muestran una tendencia similar a los ensayos de viabilidad celular previamente reportados donde marcan el mayor efecto deletéreo por parte del complejo VOcris sobre el VOsil.

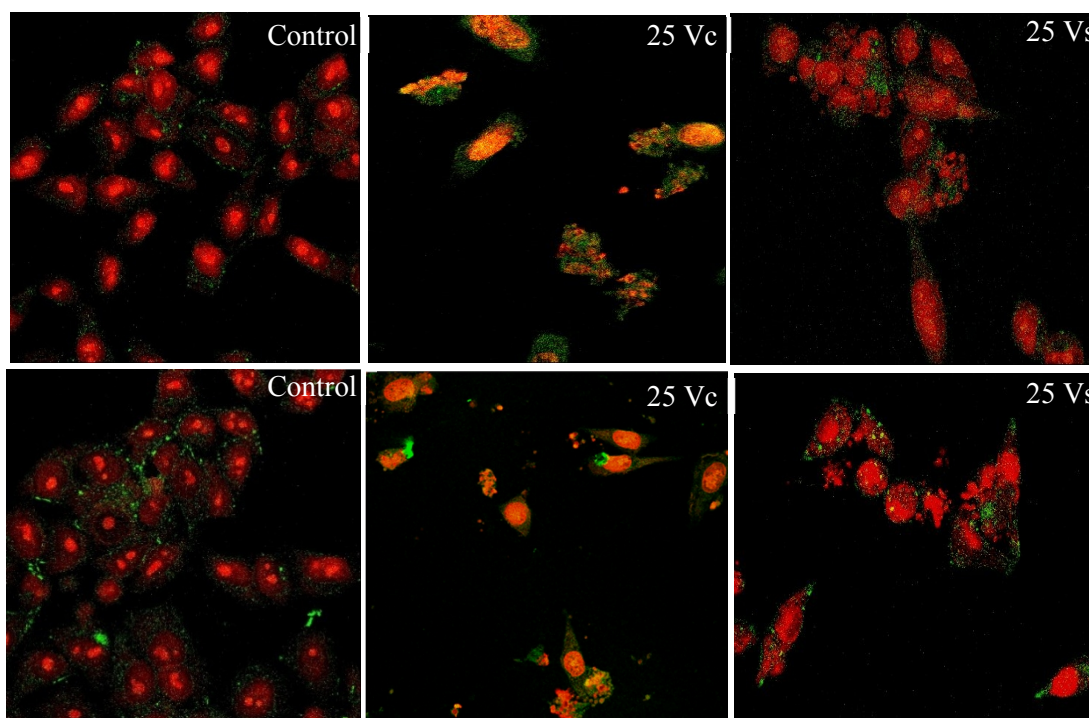


Figura 64 Efecto de VOcris y VOsil sobre la morfología de las células MG-63. Las células fueron incubadas con 25 μM de los compuestos por 24h. Posteriormente fueron teñidas con faloidina-FITC y con ioduro de propidio y observadas bajo microscopio confocal de fluorescencia.

3.4.2.2.3 Genotoxicidad

Los efectos genotóxicos generados por ambos complejos fueron investigados a través del incremento de la frecuencia de micronúcleos (MN) y la inducción del daño en el ADN.

3.4.2.2.3.1. Detección de micronúcleos

Las concentraciones testeadas para este ensayo fueron 2,5 y 5 μM (concentraciones bajas) en las cuales buscamos evidenciar los efectos genotóxicos sin un enmascaramiento por parte de los efectos citotóxicos.

Los resultados para la aparición de micronúcleos en las células binucleadas se muestran en la figura 65. En esta se observó un incremento de la cantidad de micronúcleos encontrados en las células tanto para VOcris como VOsil y para ambas concentraciones testeadas. Del análisis del mismo se evidenció una mayor inducción de micronucleos por parte del complejo VOsil por sobre VOcris, ya que en ambas concentraciones testeadas para VOsil se encontraron alrededor de 27 células portadoras de micronúcleos por sobre las 14 células resultantes del tratamiento con VOcris.

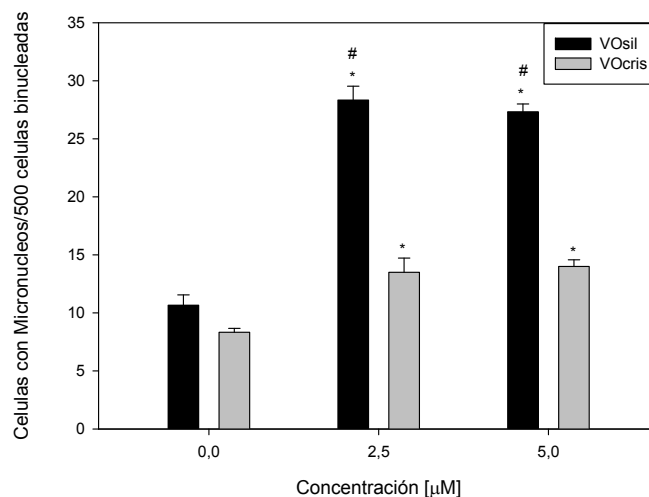


Figura 65 Inducción de micronúcleos en células MG-63. Las células fueron incubadas durante 24 h con 2,5 y 5 μM de los complejos VOcris y VOsil. Los resultados están expresados como la media \pm SEM (n=500) de 3 ensayos diferentes, *(p<0,01) significativo con respecto al Basal. # (p<0,01) significativo para concentración entre ambos compuestos testeados.

3.4.2.2.3.2. Detección de daño en el ADN a través del ensayo de cometa

El ensayo cometa fue realizado para dilucidar los efectos genotóxicos de ambos complejos de vanadio. Los ensayos fueron realizados a concentraciones bajas (2.5-10 μM) donde la citotoxicidad es baja para poder visualizar los efectos genotóxicos y que no se produzca un enmascaramiento de los mismos.

La figura 66 evidenció que no se producen cometas en las células MG-63 tratadas con 2,5 y 5 μM de VOsil mientras que esto si ocurre cuando realizamos el tratamiento con 10 μM del complejo llegándose a un valor de *Tail Moment* de aproximadamente 12. Por otro lado, cuando el complejo VOcris incrementó el valor de *Tail Moment* tanto a 2,5 como a 5 μM llegándose a valores de 10 y 14, respectivamente. Para el complejo VOcris la concentración de 10 μM no fue testeada ya que en esa concentración observamos un notorio incremento de la citotoxicidad. Además, la bleomicina fue utilizada como control positivo y para ese tratamiento se obtuvo un valor de *Tail Moment* cercano a los 52.

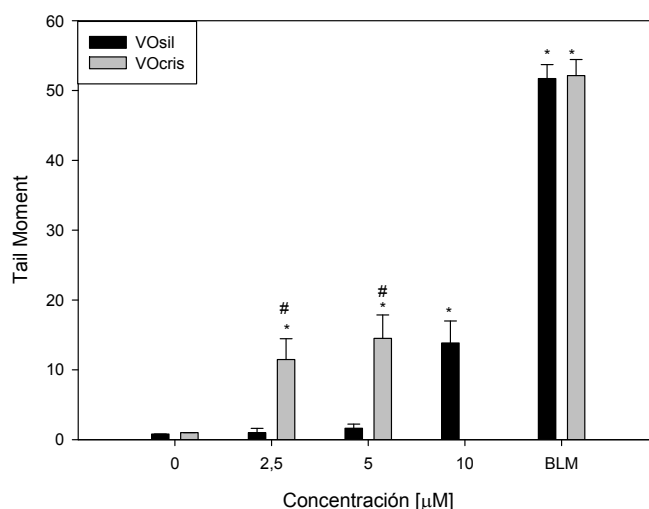


Figura 66 Inducción de daño en el ADN de células MG-63 por parte de VOcris y VOsil utilizando el ensayo de cometa. El daño en el ADN fue evaluado a través del *Tail Moment*. Luego de 24 h de incubación con los complejos, las células fueron lisadas y los fragmentos de ADN fueron corridos en electroforesis, para posteriormente ser tenidos y analizados. La bleomicina fue utilizada como control positivo. Los resultados están expresados como la media \pm SEM (n=150) de 3 ensayos diferentes, *(p<0,01) significativo con respecto al control. #(p<0,01) significativo para concentración entre ambos compuestos testeados.

3.4.2.2.4 Mecanismos de acción

Se investigaron y compararon los supuestos mecanismos de acción involucrados en los efectos antitumorales de los complejos. Así se determinó por un lado el estrés oxidativo a través de la medición de los niveles de especies de oxígeno reactivas (ROS) y el status redox celular a través de la medición de la relación entre glutation reducido (GSH) y oxidado (GSSG). Por otro lado, se realizó un exhaustivo estudio sobre el arresto del ciclo celular, los mecanismos de muerte celular por apoptosis, y activación de caspasas.

3.4.2.2.4.1 Estrés oxidativo: Generación de especies reactivas del oxígeno (ROS)

Los resultados muestran que el complejo VOcris, incrementó los niveles de ROS de una manera dependiente de la dosis a partir de los 10 μ M, mientras que el complejo VOsil aumentó esos niveles a partir de 50 μ M, con valores estadísticamente significativos frente a el control (p<0,01). La generación de ROS por parte del complejo con crisina es mayor en todo el rango testado salvo a 100 μ M donde los valores de generación de ROS (alrededor de 310% sobre el basal) generados por ambos complejos son equivalentes (p<0,01).

Estos resultados obtenidos se correlacionan con los observados en los ensayos de viabilidad celular y citotoxicidad en los cuales se observó una mayor actividad antitumoral por parte de VOcris sobre VOsil en la línea de osteosarcoma humano MG-63, demostrando que la generación de ROS podría estar vinculada como uno de los principales mecanismos de acción utilizados por estos complejos.

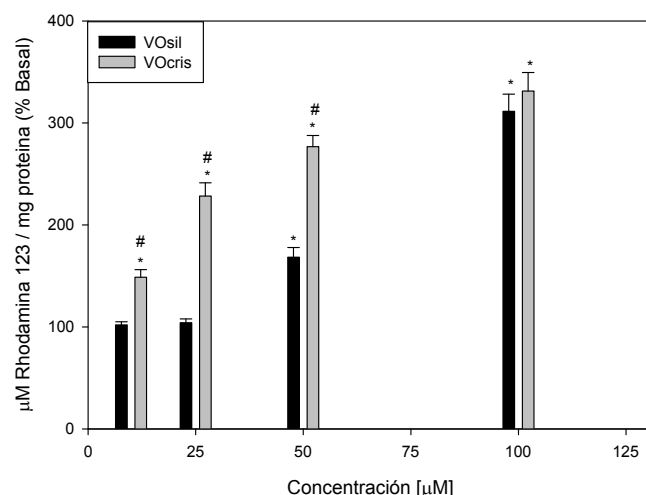


Figura 67 Generación de ROS en células MG-63 en presencia de VOcris y VOsil. Las células fueron incubadas por 24 h a 37° C con concentraciones crecientes del complejo (10, 25, 50 y 100 μM). La producción de ROS de las células se midió mediante la oxidación de DHR123 a Rodamina123. Los valores representan la media ± SEM, n=15, * p<0,01 significativo respecto al control. #(p<0,01) significativo para cada concentración de los compuestos testeados.

3.4.2.2.4.1.1 Estudios de viabilidad celular en presencia de *scavengers* de ROS

Para confirmar el rol fundamental de la generación de ROS como mecanismo de acción de los metalocompuestos involucrado en su actividad antiproliferativa en la línea de osteosarcoma humano, se llevaron a cabo los ensayos que miden viabilidad celular por cristal violeta en presencia de una mezcla equimolar de vitaminas C y E que actúan como *scavengers* o “secuestrantes” de ROS).

Los resultados de dicho ensayo se muestran en la figura 68 en la cual se puede observar que a 25 y 50 μM se produjo un recupero de la viabilidad celular debido a la presencia y el efecto de los *scavengers* de ROS (p<0,05). Por otro lado, a las concentraciones de VOcris más altas testeadas (75 y 100 μM) no se observó recuperación, debido a que el nivel de generación de ROS es mucho mayor que a las concentraciones menores generando un efecto irreversible por parte de los *scavengers*.

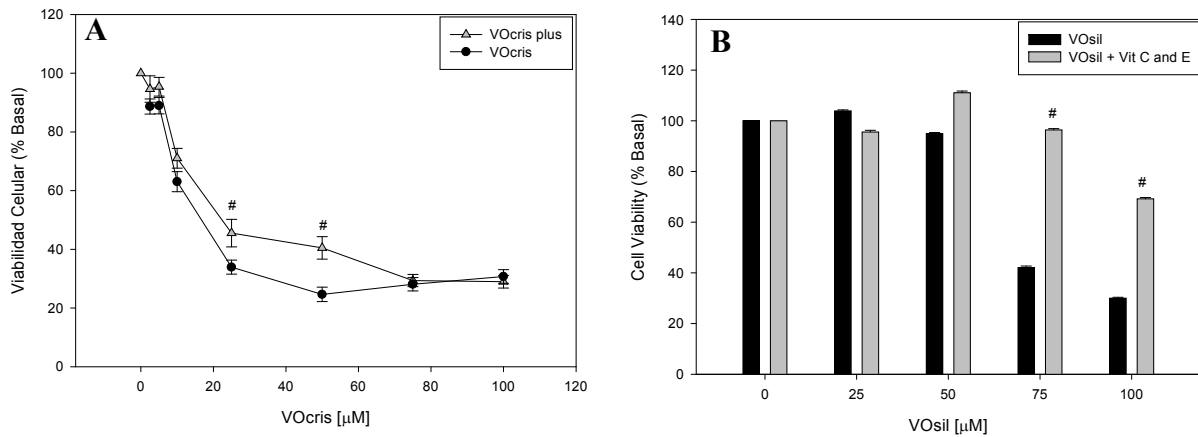


Figura 68 Efectos de VOcris (A) y VOsil (B) sobre la viabilidad celular de células MG-63 en presencia de una mezcla de vitaminas C y E. Las células fueron incubadas con distintas concentraciones de ambos complejos solos y de ambos complejos + Vit C y E (50 μM c/u) durante 24 h. Los resultados expresan la media ± SEM, n=16., # p<0,01 significativo a su correspondiente dosis en ausencia de vitaminas

3.4.2.2.4.2 Balance redox

3.4.2.2.4.2.1 Status redox celular. Determinación de glutatión reducido (GSH) y oxidado (GSSG).

Una generación sostenida de ROS usualmente produce el desbalance del estado redox intracelular, en el cual el glutatión, el tiol más abundante en las células, juega un papel fundamental. Por esta razón se determinó la relación de los niveles de GSH y GSSG después de tratar las células con 25, 50 y 100 μM de VOcris y VOsil por 24 h. Estos resultados se observan en la figura 69 donde la relación GSH/GSSG disminuyó notablemente en todos los tratamientos con ambos complejos casi por igual, salvo a 10 μM donde solo se observó efectos por parte de VOcris (p<0,01). Estos resultados indicarían que la acción de los complejos genera un desbalance en las propiedades redox de la célula de osteosarcoma como parte de uno de los mecanismos de acción antitumoral.

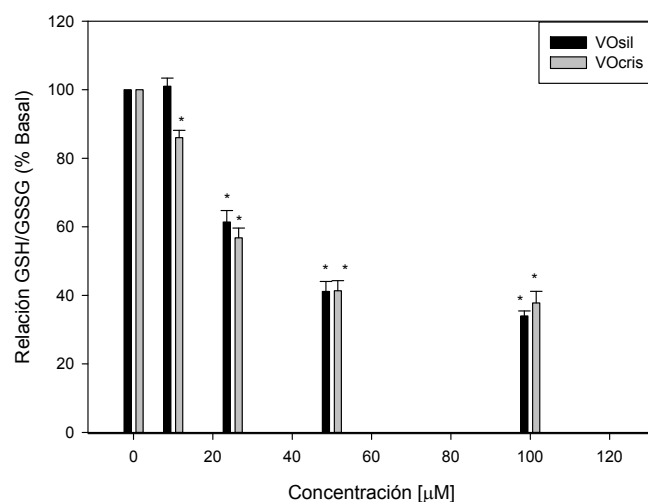


Figura 69 Relación GSH/GSSG en la línea MG-63 en presencia de distintas concentraciones de VOcris y VOsil. Los resultados expresan la media \pm SEM de tres ensayos independientes (n=15), *p<0,01 estadísticamente significativo con respecto al control.

3.4.2.2.4.2.2 Estudios de viabilidad celular en presencia de GSH.

Para confirmar el rol que juega el GSH en los mecanismos de defensa y protección para la célula cuando ésta es expuesta a la acción de los metalofármacos, se decidió realizar los ensayos que miden viabilidad celular por cristal violeta en presencia de GSH. Para esto, se realizó una preincubación con 1 mM de GSH durante 2 h y luego se agregaron concentraciones de cada complejo desde 2,5-100 µM por 24 h. Los resultados se muestran en la figura 70.

El efecto citotóxico de VOcris disminuyó en el rango de concentraciones de 10 - 50 µM debido a la presencia de GSH, observándose una recuperación de la viabilidad celular estadísticamente significativa comparada con el efecto citotóxico generado por el complejo solo (p<0.01). Al igual que en el ensayo realizado con *scavengers*, a las concentraciones de VOcris más altas testeadas (75 y 100 µM) no se observó recuperación, debido a que el nivel de generación de ROS y la depleción de los niveles de GSH probablemente sean muy grandes, generando un efecto irreversible.

Para el caso del VOsil la citotoxicidad generada por el complejo fue disminuida tanto a 25 como a 100 µM debido a la presencia de GSH, en la cual se observó una recuperación de la viabilidad celular estadísticamente significativa (p<0.01).

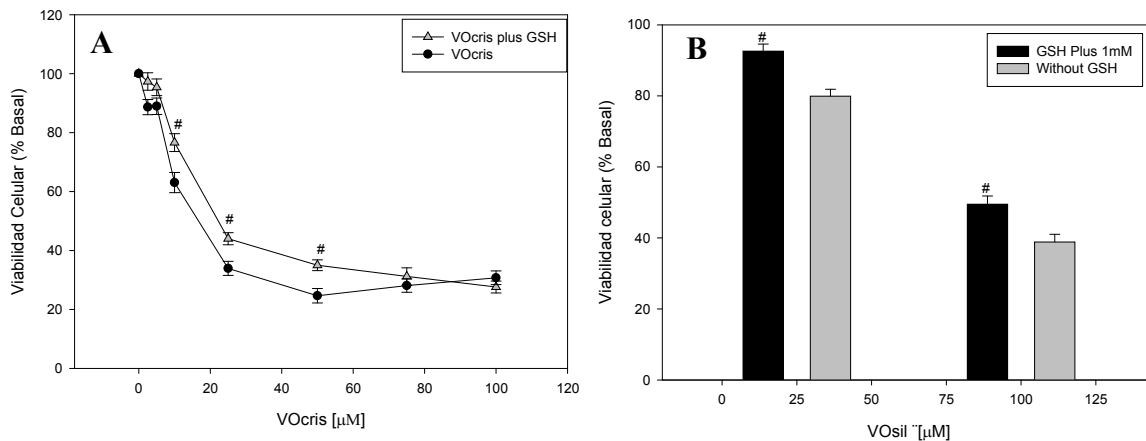


Figura 70 Efectos del VOcris y VOsil sobre la viabilidad celular de células MG-63 en presencia de GSH. Las células fueron incubadas con distintas concentraciones de VOcris o VOcris + GSH 1mM (A) o VOsil o VOsil + GSH 1mM (B) durante 24 h. Los resultados expresan la media \pm SEM, n=16., # p<0,01 significativo a su correspondiente dosis en ausencia de GSH.

3.4.2.2.4.3 Apoptosis

3.4.2.2.4.3.1 Estudio de la externalización del residuo de Fosfatidilserina (PS) por anexina V

La apoptosis es un proceso fisiológico de muerte celular potenciado por la presencia de agentes injuriantes. Este proceso genera, principalmente a nivel de membranas, diversas modificaciones en la estructura de las células. Una de las primeras modificaciones que pueden ser definidas es la externalización del fosfolípido fosfatidilserina (PS) a la cara externa de la membrana plasmática, considerándose esta una medida de las etapas tempranas de la apoptosis. Para visualizar el progreso en función del tiempo y de la concentración de los mecanismos de muerte por apoptosis, se realizaron ensayos de externalización de PS a 3,6 y 24 h de incubación con VOcris. Los resultados indicaron que 3 h de incubación con el complejo es muy poco tiempo para activar el proceso de muerte celular ya que los valores obtenidos por citometría de flujo son estadísticamente iguales a los controles. Sin embargo, cuando a el complejo lo incubamos por 6 h se observó un marcado incremento de células anexina V(+)/ IP(-). La figura 71 muestra la cuantificación de células apoptóticas determinadas por citometría de flujo en MG-63 incubada con 25 y 100 μ M, respectivamente. Los resultados indican que para el control tuvimos un valor del 4% de células anexina V(+)/ IP(-), a 25 μ M tuvimos un 19% y a 100 μ M ese valor es del 21 %, indicando la presencia de células en apoptosis temprana a ambas concentraciones (p<0,01).

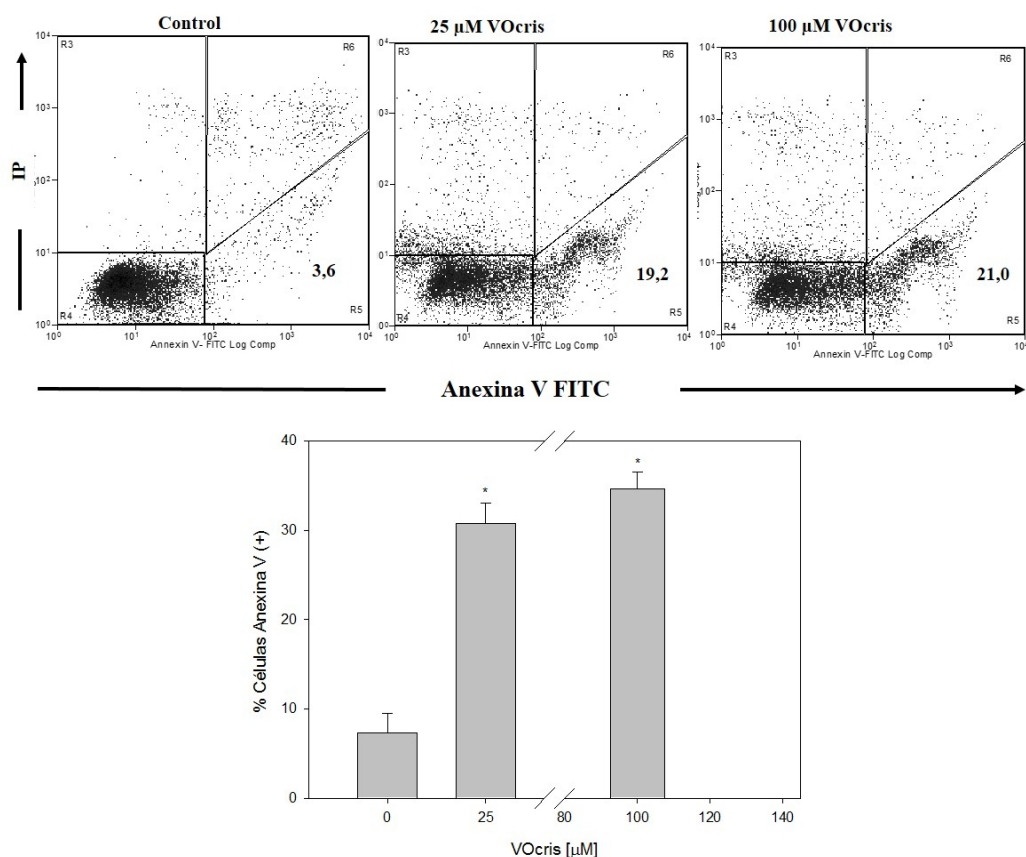


Figura 71 Efectos de VOcris sobre la apoptosis en células MG-63 determinada por citometría de flujo mediante Anexina V/ Ioduro de Propidio (IP). Las células fueron tratadas durante 6 h con 0 (basal), 25 y 100 μ M del compuesto. Los plots son representativos de tres experimentos independientes. Los números indican el porcentaje de células Anexina V(+)/(-). Los resultados en la gráfica de barras expresan la media \pm SEM de tres ensayos independientes (n=9), *p<0,01 estadísticamente significativo con respecto al control.

Los resultados encontrados luego de 24 h de incubación se detallan en la tabla 5. En esta se puede apreciar un claro incremento de las células Anexina V(+)/ IP(+) indicando presencia de células en apoptosis tardía, ya que para 25 μ M tuvimos un 49% y para 100 μ M ese valor asciende al 74% frente al 3% obtenido para el control (p<0,01).

Tabla 5 Valores expresados en porcentajes de células para cada condición a 24 h de incubación

VOcris [μ M]	Anexina V (-) /IP (-)	Anexina V (+)/ IP(-)	Anexina V (+)/ IP (+)
0	94%	0,3%	3,3%
25	34,5%	4,3%	48,7%
100	14,5%	6,6%	74,1%

Analizando los resultados a 6 y 24 h concluimos y demostramos que el proceso de muerte celular por apoptosis inducido por VOcris, progresa en función del tiempo y de la concentración.

Continuando con los estudios que evalúan los mecanismos de muerte utilizada por los metalofármacos, se decidió realizar una evaluación similar a la hecha anteriormente pero con el complejo de vanadio y silibinina (VOsil). Para esto se realizaron ensayos de evaluación de la exposición de PS por Anexina V a 6 y 24 h de incubación.

Los resultados de estos se observan en la figura 72 y en la tabla 6. Luego de 6 h de incubación el control (medio de cultivo sin adición de suero fetal bovino) mostró un 10%

de células Anexina V(+)/ IP(-). y un 4% de células Anexina V(+)/ IP(+). Estos resultados cambiaron con 24 hs de incubación evidenciando un incremento a un valor de 16% en la fracción correspondiente a las células Anexina V(+)/ IP(+). Para los tratamientos realizados, se observó que luego de 6 h de incubación, VOsil generó un 29 % y un 32% de células apoptóticas tempranas (Anexina V(+)/ IP(-)) a 25 y 100 μ M, respectivamente. Sin embargo, solo a 100 μ M, el complejo indujo un 28% de células apoptóticas tardías (Anexina V(+)/ IP(+)). Por otro lado, luego de 24 h de tratamiento, VOsil causó un 37% de células apoptóticas tempranas (Anexina V(+)/ IP(-)) y un 29% de células apoptóticas tardías (Anexina V(+)/ IP(+)) a 25 μ M, mientras que a 100 μ M el complejo produce un notable incremento en la fracción de células apoptóticas tardías.

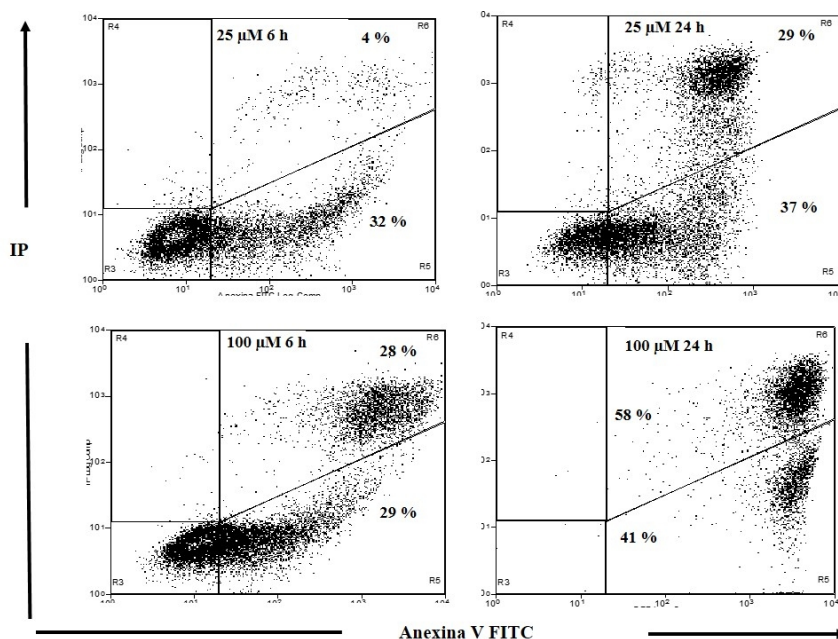


Figura 72 Efectos de VOsil sobre la apoptosis en células MG-63 determinada por citometría de flujo mediante Anexina V/ Ioduro de Propidio (IP). Las células fueron tratadas durante 6 h Y 24 h con 0 (basal), 25 y 100 μ M del compuesto. Los plots son representativos de tres experimentos independientes. Los números en los cuadrantes indican el porcentaje de células Anexina V(+)/ IP(-) y Anexina V(+)/IP(+).

Tabla 6 Valores expresados en porcentajes de células para cada condición luego de 6 y 24 h de incubación. Los resultados expresan la media \pm SEM de tres ensayos independientes (n=9), *p<0,01 estadísticamente significativo con respecto al control.

VOsil [μ M]	Anexina V(+)/ IP(-)		Anexina V(+)/ IP(+)	
	6h	24 h	6 h	24 h
0	10% \pm 2	5% \pm 1	4% \pm 1	16% \pm 4
25	29% \pm 4	37% \pm 7	4% \pm 1	29% \pm 6
100	32% \pm 5	41% \pm 11	28% \pm 5	58% \pm 12

Los resultados de inducción de la exposición del residuo de PS muestran una correlación directa con aquellos resultados observados en los ensayos de viabilidad celular, citotoxicidad y generación de ROS.

3.4.2.2.4.3.2 Activación de caspasa-3

Las caspasas son un grupo de proteínas pertenecientes al grupo de las cistein-proteasas que median e intervienen en los procesos de muerte celular programada (apoptosis). La caspasa-3 es una de las más importantes y críticas ya que es una caspasa efectora que participa clivando diferentes sustratos relacionados con otras caspasas involucrados en la regulación de la apoptosis (Sakahira y col. 1998). En la figura 73 podemos observar los resultados de la activación de caspasa-3 determinada por el kit **Caspase 3 Assay Kit Colorimetric™ (SIGMA)** en el cual se siguió por una determinación espectrofotométrica. Los resultados mostraron que después de 6 h de incubación con VOcris se produjo la activación de la caspasa-3 siguiendo una tendencia dosis respuesta, ya que a 25 μM se generó una activación del 100% y a 100 μM del 250% por sobre la actividad del control ($p < 0,01$).

La activación de la caspasa-3 es un buen marcador de apoptosis que complementa la información obtenida en los ensayos de exposición de PS anteriormente realizados.

Estos resultados son consistentes con lo observado en el ensayo de exposición de PS y confirman la acción proapoptótica por parte del complejo VOcris en la línea de osteosarcoma humano MG-63.

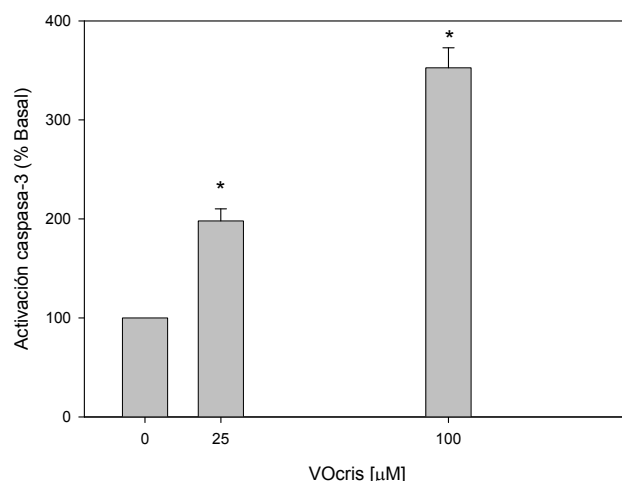


Figura 73 Efectos de VOcris sobre la activación de la caspasa-3 en células MG-63. Las células fueron tratadas durante 6 h con 0 (basal), 25 y 100 μM del compuesto y luego se realizaron las mediciones de los niveles de caspasa-3 en el extracto celular obtenido. Los resultados expresan la media \pm SEM de tres ensayos independientes ($n=9$), * $p < 0,01$ estadísticamente significativo con respecto al control.

Por otro lado, en la figura 74 observamos el efecto del complejo VOsil sobre la activación de caspasa-3 determinada por el kit **Caspasa 3 Assay Kit Pharmingen™ (BD)** donde las determinaciones fueron realizadas por citometría de flujo. Los resultados indicaron que luego de 6 h de incubación con el complejo solo a 100 μM se produce la activación de la caspasa-3, llegándose a una activación de 1400% por sobre el control ($p < 0,01$). Estos resultados son congruentes con lo observado en el ensayo de anexina V a 6 h en el cual solo se observó presencia de células apoptóticas tanto tempranas como tardías (anexina V(+)/ IP(+)) que se relacionan con la activación de la caspasa-3 a 100 μM . Con este ensayo se confirman los efectos apoptóticos generados por el complejo VOsil en la concentración más alta testada.

Si bien la activación de caspasa-3 para ambos complejos fueron determinadas por dos medios distintos lo que hace difícil una comparación en cuanto a valores de activación, si podemos afirmar que el complejo VOcris tiene los efectos más exacerbados para la

activación de caspasa-3 ya que activa a esta misma tanto a 25 como a 100 μM , mientras que el complejo VOsil solo lo hace a 100 μM .

La determinación de la caspasa-3 es otra evidencia más que nos demuestra el rol fundamental que juega la apoptosis como mecanismo de acción preponderante en la actividad antiproliferativa de ambos complejos.

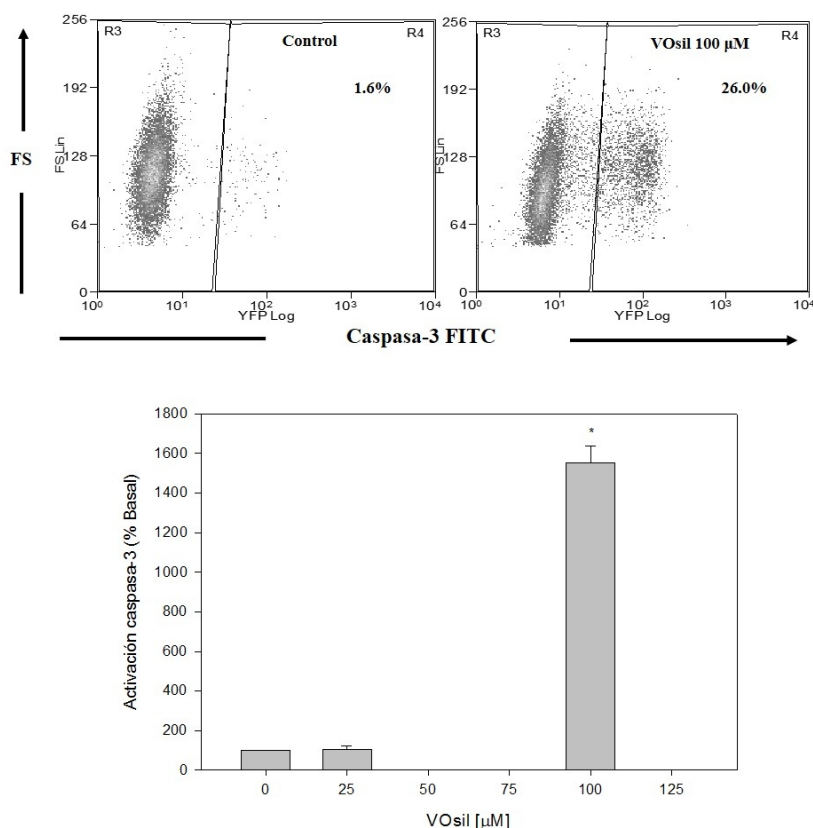


Figura 74 Efectos de VOsil sobre la activación de la caspasa-3 activa en células MG-63. Las células fueron tratadas durante 6 h con 0 (basal), 25 y 100 μM del compuesto y luego se realizaron las mediciones de los niveles de caspasa-3 activa en las células. Los resultados expresan la media \pm SEM de tres ensayos independientes (n=9), *p<0,01 estadísticamente significativo con respecto al control.

3.4.2.2.4.3.3 Análisis del ciclo celular y fragmentación del ADN

Continuando con los estudios de los posibles mecanismos de acción por parte de los metalocompuestos, se decidió estudiar la acción de los mismos sobre el ciclo celular. Este es un conjunto ordenado de sucesos que conducen al crecimiento de la célula y la división en dos células hijas.

El arresto del ciclo celular y la progresión de la apoptosis en función de la concentración de los complejos y del tiempo de exposición a estos fueron llevados a cabo por citometría de flujo y posterior análisis con el programa FlowJo 7.6.

Los resultados para el complejo VOcris se muestran en la figura 75, en la cual se realizó el ensayo a tres tiempos distintos (6,16 y 24 h). A 6 h observamos que se produjo un pequeño arresto del ciclo celular en fase G_2/M a 25 μM , mientras que a 100 μM las células fueron directamente enviadas a apoptosis. La visualización de un incremento en la fracción del pico Sub G_1 nos indica la presencia de células con ADN fragmentado en un estadio tardío de apoptosis. Como se observa en la figura 75 a medida que progresa el tiempo para ambas concentraciones testeadas se observó un incremento en la fracción de

células con el ADN fragmentado (pico Sub G₁), donde nuevamente los efectos se encuentran maximizados a 100 μM por sobre 25 μM.

Estos resultados demuestran que el complejo VOcris tiene un efecto citotóxico muy alto y que actúa a tiempos muy cortos, ya que a 6 h observamos una gran presencia de células en apoptosis.

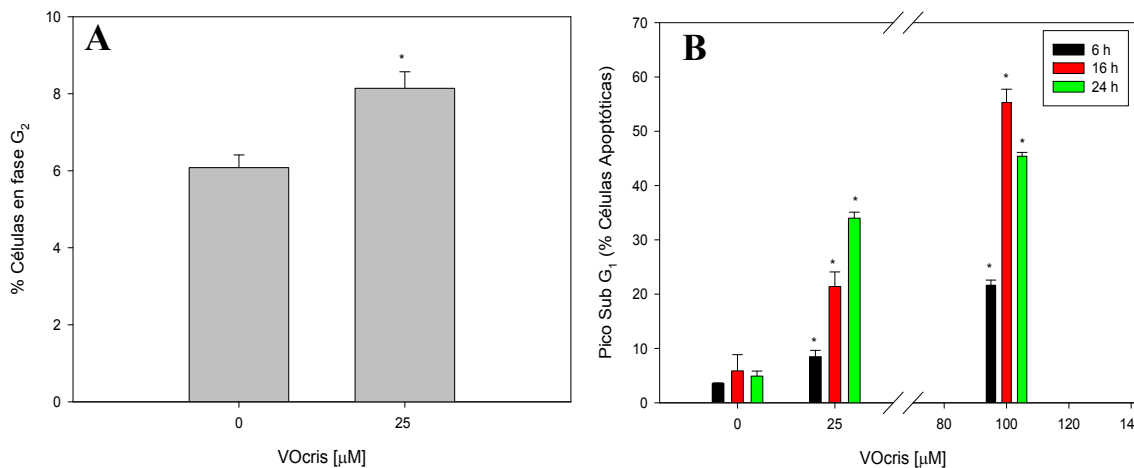


Figura 75 Efectos de VOcris sobre el arresto del ciclo celular (A) y la fragmentación del ADN (B). Las células fueron tratadas durante 6, 16 y 24 h con 0 (basal), 25 μM y 100 μM del compuesto y luego tenidas con Ioduro de Propidio y analizados con el FlowJo 7.6. Los resultados expresan la media ± SEM, n=9., *p<0,01 estadísticamente significativo con respecto al control.

Por otro lado, un análisis similar se realizó para el complejo de vanadio y silibinina.

La figura 76 muestra los resultados del arresto del ciclo celular producido por VOsil a 6 y 24h. A 6 h el complejo generó un arresto del ciclo celular en la fase G₂/M solo a 100 μM (p<0,05), mientras que a 24 h de incubación el arresto del ciclo celular en fase G₂/M fue producido a 25 μM. Además, a ese mismo tiempo y a ambas concentraciones testeadas el complejo envió las células a apoptosis, ya que se observó un incremento del 23% y el 39% de células en la fracción del pico Sub-G₁ que nos indican fragmentación del ADN celular.

El efecto deletéreo del complejo ocurre en función del tiempo de exposición y de su concentración en donde se ven exacerbados los efectos a mayores tiempos y dosis.

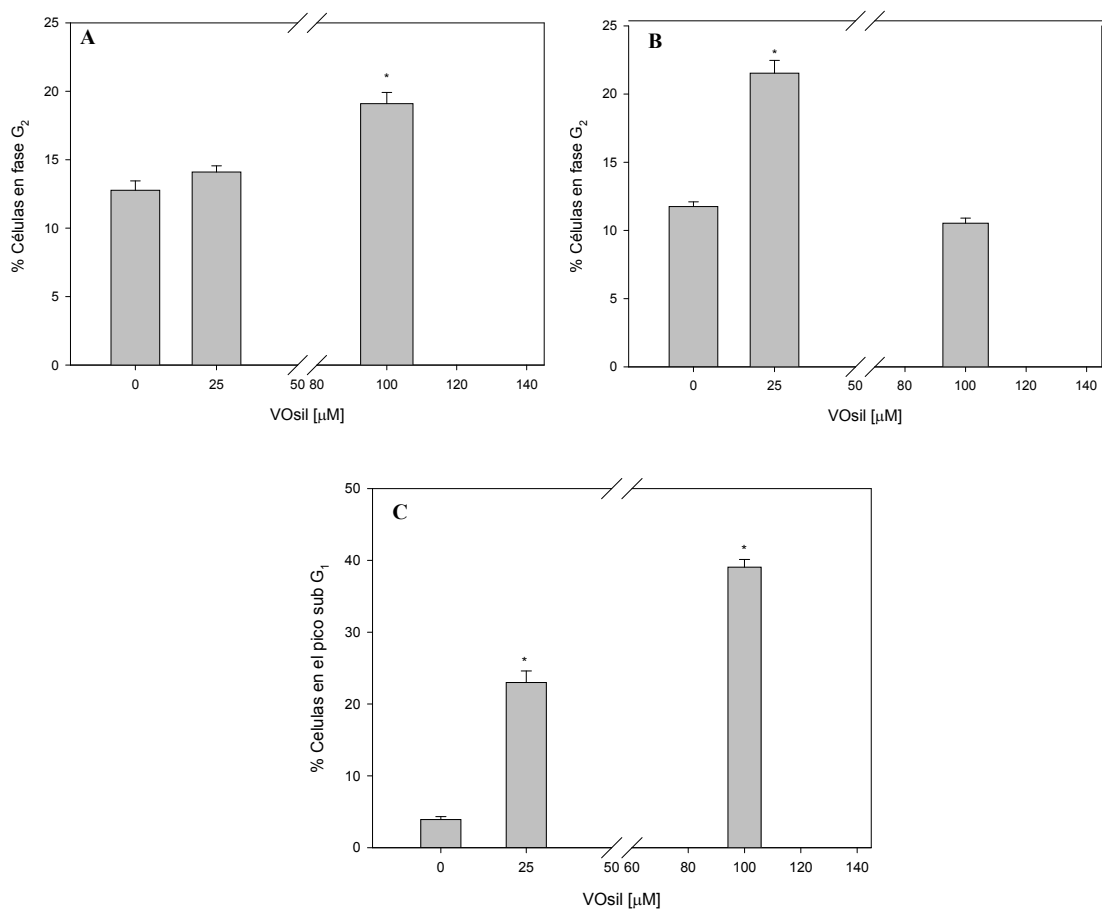


Figura 76 Efectos de VOsil sobre el arresto del ciclo celular (A y B) y la fragmentación del ADN (C). Las células fueron tratadas durante 6 (A) y 24 h (B y C) con 0 (basal), 25 μM y 100 μM de VOsil y luego tenidas con Ioduro de Propidio y analizados con el FlowJo 7.6. Los resultados expresan la media \pm SEM, n=9., *p<0,01 estadísticamente significativo con respecto al control, #p<0,01 estadísticamente significativo con respecto al control. # p<0,01 significativo entre concentraciones testeadas.

En conclusión si analizamos los resultados obtenidos para ambos complejos observamos que el VOcris tiene un efecto drástico y más rápido sobre la muerte celular por apoptosis en las células de osteosarcoma debido a que a 6 h genera una alta fracción de células apoptóticas, mientras que el VOsil tiene un efecto menor generando un previo arresto en fase G₂/M para recién a 24 h enviar las células a apoptosis. Estos resultados son congruentes con los observados para las otras técnicas en las cuales se analizó los mecanismos de muerte celular programada (Anexina V y activación de caspasa-3).

3.4.2.2.4.4 Rol de las galectinas 1 y 3 (Gal 1 y Gal 3) en los mecanismos de muerte celular

3.4.2.2.4.4.1 Análisis de los cambios en la expresión de Gal 1 y Gal 3

Los cambios en la expresión de las Gal 1 y 3 inducidas por los complejos de vanadio (VOcris y VOsil) fueron estudiados a través de la técnica de RT-PCR (Transcripción reversa de la reacción de la cadena polimerasa). Para esto se probaron tres concentraciones de ambos complejos (10, 25 y 100 μM) y dos tiempos de incubación (1 y 3 h), en los cuales los complejos no afectan la viabilidad celular. Los resultados evidenciaron una disminución de los niveles de expresión de ARN mensajero (ARNm)

de Gal 1 del 20 y 25 % sobre el nivel basal luego de 1 h de incubación con 25 y 100 μM de VOcris, respectivamente. En las mismas condiciones de incubación se observó una disminución de la expresión de Gal 3 del 20 y del 45 % cuando incubamos con 10 y 25 μM del complejo con crisina. Cuando incubamos por 3 h con el compuesto se encontró una tendencia similar para la Gal 3 pero solo hubo disminución de la expresión de la Gal 1 de aproximadamente el 20% cuando incubamos con 100 μM . Para el caso del complejo VOsil, no se observaron efectos luego de 1 h de incubación, pero luego de 3 h se observó una disminución del 30% en la expresión de ambas galectinas. En conclusión si analizamos los resultados obtenidos observamos que ambos complejos disminuyen los niveles de expresión del ARNm de la Gal 1 y Gal 3, utilizando este efecto como un posible mecanismo de acción antitumoral.

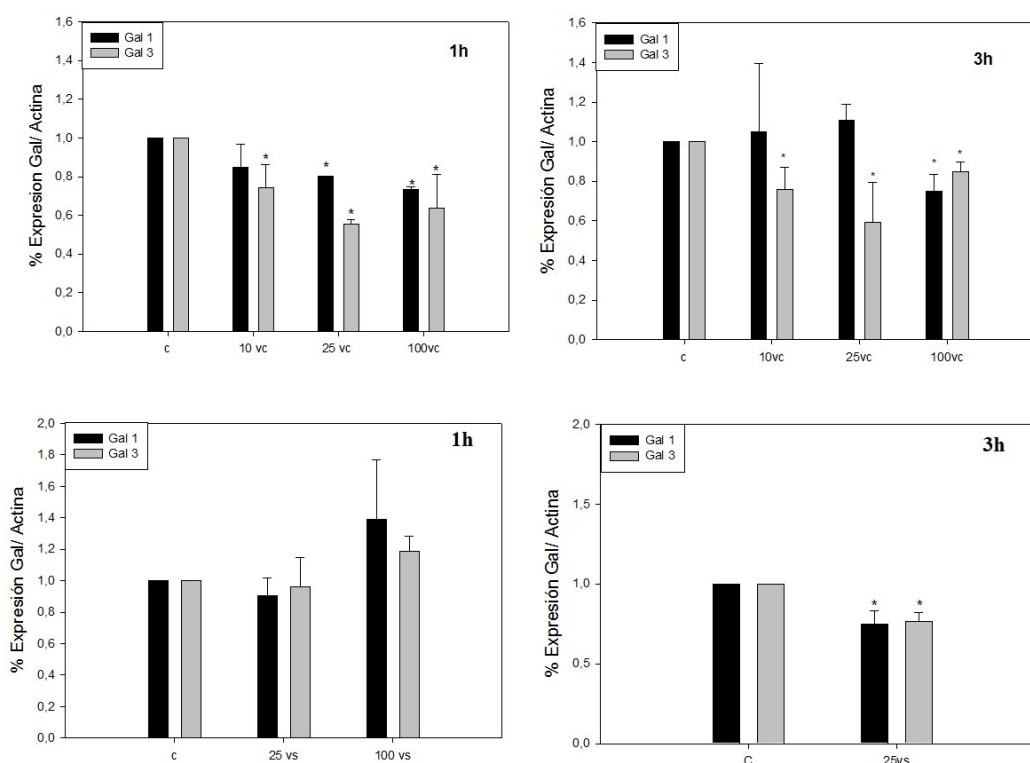


Figura 77 Efectos de VOcris (Vc) y VOsil (Vs) sobre la expresión del ARNm de Gal 1 y Gal 3. Las células fueron tratadas durante 1 y 3 h con 0 (basal), 10, 25 y 100 μM de ambos compuestos y luego analizadas por la técnica de RT-PCR. Los resultados expresan la media \pm SEM, $n=9$., $*p<0,01$ estadísticamente significativo con respecto al control.

3.4.2.2.4.4.2 Análisis de los cambios en la expresión de Neuraminidasa 1 y 3.

Se analizaron los efectos en los cambios en la expresión del ARNm de las enzimas neuraminidasa 1, 2, 3 y 4 (Neu 1, Neu 2, Neu 3, Neu 4) para los complejos de vanadio con crisina y silibinina. Los resultados dieron amplificación para Neu 1 y 3, pero no se observaron niveles de ARNm de Neu 2 y Neu 4 en la línea celular MG-63 para estas condiciones de ensayo.

La figura 78 muestra los resultados para la Neu 1 y 3. Luego de 3 h de incubación con los compuestos evidenciaron un incremento significativo de alrededor del 50% de ambas enzimas para 25 y 100 μM de VOcris y un aumento del 70% para 100 μM de VOsil. Luego de 6 h de incubación observamos un efecto dosis respuesta (10, 25 y 100 μM) para el VOcris alcanzándose incrementos en los mensajeros de la Neu 1 de un 300% sobre el

nivel basal. Para el complejo VOsil observamos un aumento del 400% cuando realizamos el tratamiento con 25 μ M. Contrariamente, cuando analizamos lo sucedido para la Neu 3 observamos que para ambos complejos y en todo el rango de concentraciones testado existe una disminución drástica de la expresión de esta enzima. Estos resultados podrían estar eventualmente relacionados con la actividad de estas enzimas en la superficie celular sobre los diferentes residuos de ácido siálico dejando así expuestos residuos de galactosa que funcionen como blancos terapéuticos de otras moléculas.

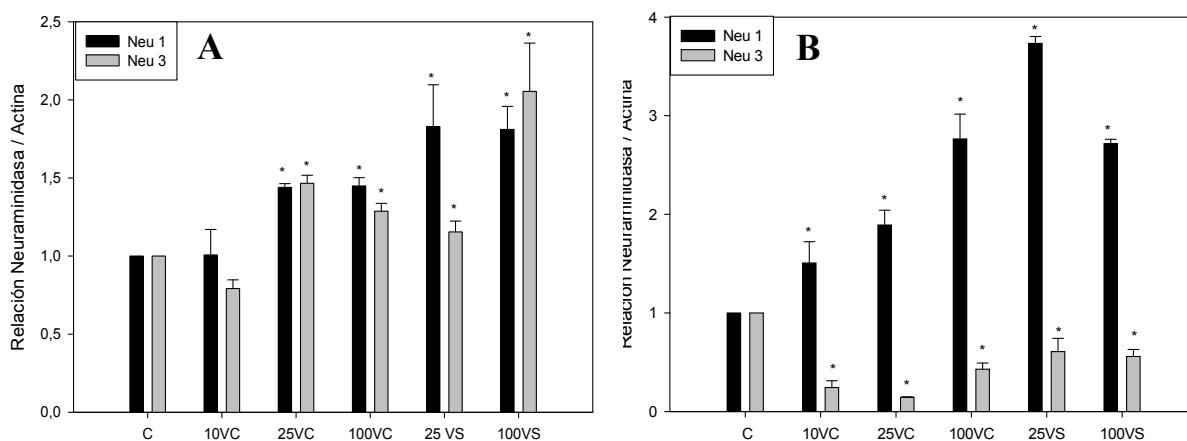


Figura 78 Efectos de VOcris y VOsil sobre la expresión del ARNm de las neuraminidasas 1 y 3 (Neu 1 y 3). **A.** Las células fueron tratadas durante 3 h con 0 (basal), 10, 25 y 100 μ M de VOcris y VOsil. **B.** Las células fueron tratadas durante 6 h con 0 (basal), 10, 25 y 100 μ M de VOcris y VOsil. Los resultados expresan la media \pm SEM, n=9., *p<0,01 estadísticamente significativo con respecto al control.

3.4.2.2.4.4.3 Análisis de la secreción de Gal 1 y Gal 3

Con el fin de evaluar los efectos de ambos complejos sobre la secreción de las galectinas se evaluaron los cambios en la concentración de las mismas en el sobrenadante de cultivo. Se testearon los efectos de ambos complejos a 25 y 100 μ M a 1, 3, 6 y 16 h. Los resultados mostraron que no hay cambios en la concentración de la Gal 1 luego de 1 hora de incubación con los complejos. Cuando la incubación realizada fue de 3 h se observó una disminución en la concentración de Gal 1 tanto a 25 como a 100 μ M. Los valores del control mostraron un valor aproximado de 42 ngr/mL de Gal 1 en comparación con los 34 y 26 ng/mL encontrados luego del tratamiento con 25 y 100 μ M de VOcris, respectivamente. Luego de 6 h de incubación esos valores se restablecen sin encontrarse ninguna diferencia entre los tratamientos realizados y el control, a diferencia de lo observado a 3 h. Posteriormente se testeó un tiempo más largo (16 h) en donde los efectos deletéreos de los metalofármacos se encontraban exacerbados para ver cuál era el efecto sobre la secreción de las galectinas. Los resultados evidenciaron que para los tratamientos con 10 y 25 μ M de VOcris se observó un aumento significativo en la concentración de Gal 1 en el sobrenadante a valores que ascienden los 50 ng/mL en comparación con los 40 ngr/mL encontrados en el control. Los valores de Gal 3 en todos los ensayos realizados fueron menores a 10 ngr/mL que fue el límite de la curva de calibración utilizada.

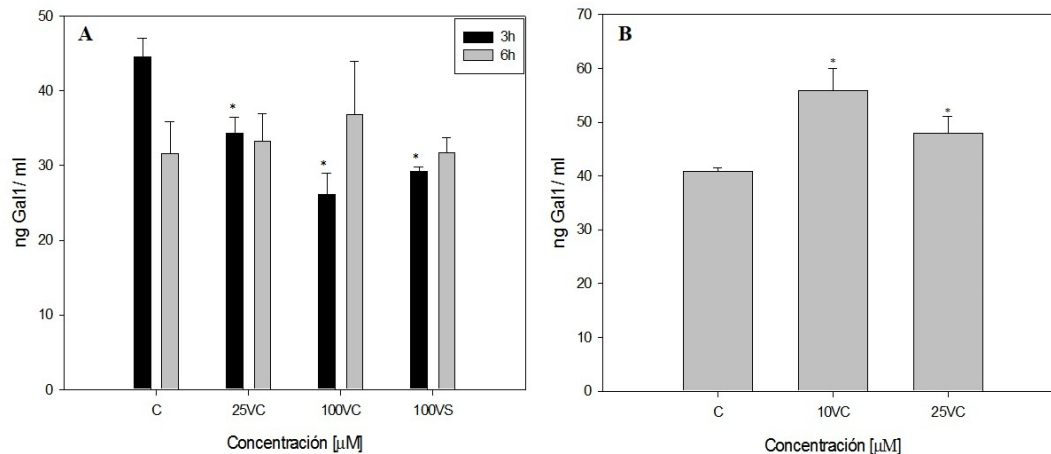


Figura 79 Efectos de VOcris y VOsil sobre la secreción de Gal 1 y Gal 3. **A.** Las células fueron tratadas durante 3 y 6 h con 0 (basal), 25 y 100 μ M de VOcris y VOsil. **B.** Las células fueron tratadas durante 16 h con 0 (basal), 10, 25 μ M de VOcris. Luego del tratamiento se colectaron los sobrenadantes, se precipitaron las proteínas y se realizó la medición de Gal 1 y Gal 3 por el método de ELISA. Los resultados expresan la media \pm SEM, n=9., *p<0,01 estadísticamente significativo con respecto al control.

Con estos resultados se realizó otro análisis pero esta vez teniendo en cuenta los nanogramos (ngr) de Gal 1 secretados en el sobrenadante en relación a la cantidad de proteína total. Los resultados obtenidos mostraron que a 1 h de incubación no se observan variaciones en la relación de ngr Gal 1/ μ gr de proteína entre los tratados y el control. Esa situación es modificada cuando analizamos lo ocurrido a 3 h en la cual se observó una disminución estadísticamente significativa y dosis respuesta de la relación de ngr Gal 1/ μ gr de proteína para el tratamiento con 25 y 100 μ M de VOcris al igual que para el tratamiento con 100 μ M de VOsil. Cuando la incubación se prolongó a 6 h se observó un incremento en la relación ngr gal 1/ μ gr de proteína para el tratamiento con VOcris con respecto al control pero continua la disminución de la misma cuando realizamos el tratamiento con 100 μ M de VOsil. Estos resultados estarían fundamentados y correlacionados con lo observado en el análisis de la expresión de ARNm en el cual a 3 h observamos una disminución en el tratamiento con ambos complejos. Con respecto a lo observado a 6 h es de esperar un aumento en la relación de galectina secretada debido a que en ese tiempo la acción deletérea por parte del complejo VOcris es muy grande lo que estaría llevando a la muerte y lisis celular y la posterior liberación de galectina intracelular al medio extracelular. Ese efecto no es observado cuando el tratamiento se realiza con el complejo VOsil en el cual los efectos antiproliferativos son menores que para el complejo VOcris a ese tiempo.

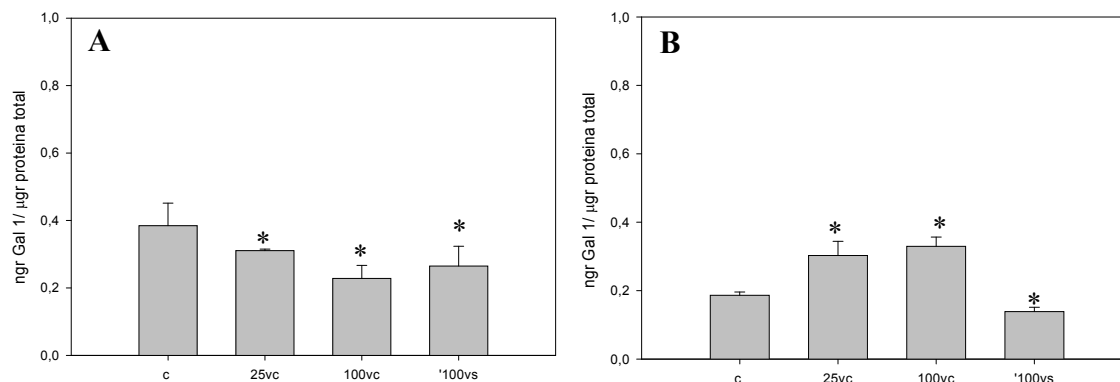


Figura 80 Efectos de VOcris y VOsil sobre la secreción de Gal 1 y Gal 3. **A.** Las células fueron tratadas durante 3 h con 0 (basal), 25 y 100 μ M de VOcris y 100 μ M de VOsil. **B.** Las células fueron tratadas durante 6 h con 0 (basal), 25 y 100 μ M de VOcris y 100 μ M de VOsil. Luego del tratamiento se colectaron los sobrenadantes, se precipitaron y se midieron la cantidad de proteínas y se realizó la medición de Gal 1 y Gal 3 por el método de ELISA. Los resultados expresan la media \pm SEM, n=9., *p<0,01 estadísticamente significativo con respecto al control.

3.4.2.2.4.4.4. Estudio de la exposición de azúcares en superficie utilizando lectinas comerciales

La determinación de la exposición de azúcares en superficie fue realizada utilizando distintas lectinas comerciales específicas como: MAA (*Mackia amurensis*), SBA (*Soybean*), SNA (*Sambucus Nigra*), PNA (*Arachis Hypogaea*), Ulex y concanavalina A. La unión de las lectinas a los azúcares fue determinada por técnicas de ELISA y de citometría de flujo.

3.4.2.2.4.4.4.1 ELISA

La figura 81 muestra los resultados obtenidos para los tratamientos con 25 y 100 μ M de VOcris y VOsil por 3 h de la unión de PNA y MAA que reconocen específicamente galactosa y ácido siálico (enlace α 2,3) en la superficie celular. En estos se observó que a 100 μ M existe un aumento de la unión de PNA y MAA a la superficie celular del 200 y 185% sobre el basal, respectivamente. La sialidasa comercial (50 mU/mL) fue utilizada como control positivo y en ambos ensayos se observó una excelente actividad de la misma incrementando los niveles de unión de PNA y disminuyendo la unión de MAA.

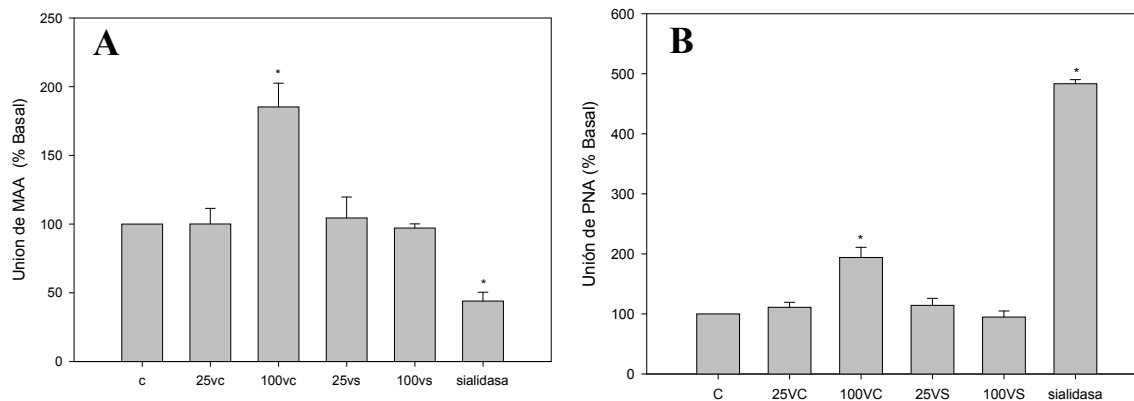


Figura 81 Efectos de Vocris y VOsil sobre la unión de las lectinas comerciales MAA (A) y PNA (B) Las células fueron tratadas durante 3 h con 0 (basal), 25 y 100 μ M de Vocris y VOsil para luego incubarlas 1 h con 10 μ g/mL de cada lectina a temperatura ambiente. La sialidasa comercial (50mU/mL) proveniente de *Clostridium perfringens* fue utilizada como control positivo. Los resultados expresan la media \pm SEM, n=9., *p<0,01 estadísticamente significativo con respecto al control

3.4.2.2.4.4.2 Citometría de flujo

Con el fin de profundizar y chequear los resultados obtenidos para la unión de las diversas lectinas por el método de ELISA se realizó un ensayo similar pero esta vez utilizando lectinas acopladas a FITC y realizando las medidas de fluorescencia por citometría de flujo.

En la figura 82 se pueden observar los valores que tienen el promedio de las medias de ambas poblaciones (control y tratadas con 100 μ M de Vocris) que reflejan y confirman el aumento en la unión de PNA y MAA en la superficie de las células MG-63 luego del tratamiento con 100 μ M de Vocris. Los resultados obtenidos demostraron la misma tendencia encontrada para el ensayo de ELISA en el cual se observó un incremento en los valores de unión de PNA y MAA. Estos resultados en su conjunto indicarían que el tratamiento con el complejo de vanadio y crisina estaría incrementando la exposición en la superficie celular de galactosa y de ácido siálico, acción que podría ser utilizada para crear una terapia combinando este efecto con los efectos pro apoptóticos de las galectinas exógenas.

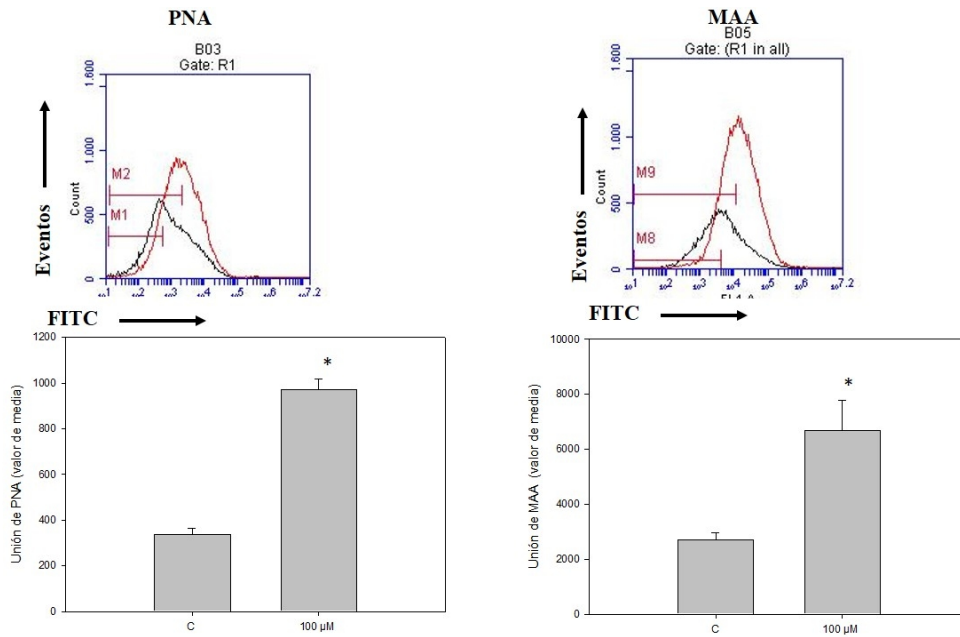


Figura 82 Efectos de VOcris sobre la unión de las lectinas comerciales PNA y MAA. Las células fueron tratadas durante 3 h con 0 (basal) y 100 μ M de VOcris para luego incubarlas 1 h con 10 μ gr/mL de cada lectina a temperatura ambiente. La sialidasa comercial (50mU/mL) proveniente de *Clostridium perfringens* fue utilizada como control positivo. Los resultados expresan la media \pm SEM, n=9., *p<0,01 estadísticamente significativo con respecto al control.

3.4.2.2.4.4.5 Estudio de los efectos pro-apoptóticos de las galectinas 1 y 3 exógenas

Se estudiaron los efectos de inducción de la muerte celular programada por Gal 1 y Gal 3 exógenas. Para esto se utilizaron 150 μ g/mL de Gal 1 y 3 adicionadas de forma exógena durante 6 y 24 h de incubación. Luego de 6 h los resultados evidenciaron un significativo aumento de las poblaciones de necrosis y apoptosis tardía para Gal 1 y de apoptosis temprana, tardía y necrosis para Gal 3. Los porcentajes evidenciaron una fracción de 62 % de células anexina V(+)/ IP(+) para la inducción con Gal 1 y del 31% para la Gal 3 (Figura 83). A las 24 h el efecto de ambas galectinas sobre la muerte celular demostró ser muy deletéreo ya que para el tratamiento con Gal 1 la fracción de células anexina V (+)/ IP(+) fue del 70 % y para la Gal 3 ese valor fue de 48%, registrándose también una fracción de células células anexina V (+)/ IP(-) del 40%.

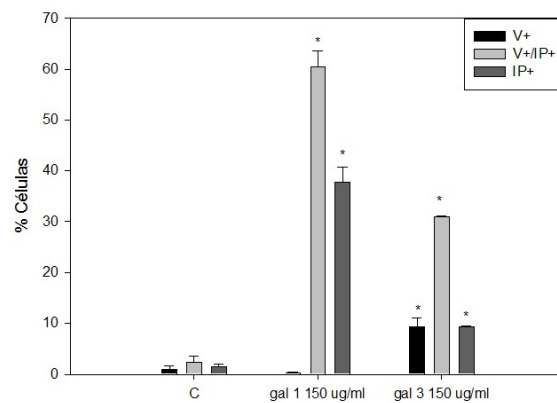
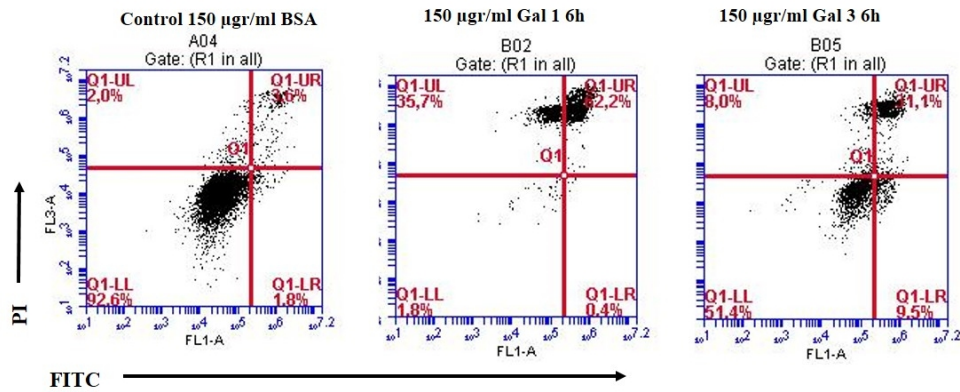


Figura 83 Efectos sobre la apoptosis celular de las Gal 1 y Gal 3 exógenas determinada por citometría de flujo mediante Anexina V/ IP. Las células MG-63 fueron tratadas durante 6 h con 150 µg/mL BSA(basal), 150 µg/mL Gal 1 y Gal 3. Los plots son representativos de tres experimentos independientes. Los resultados de la gráfica de barras expresan la media ± SEM, n=9., *p<0,01 estadísticamente significativo con respecto al control

Posteriormente se estudiaron los efectos de ambas galectinas en presencia de lactosa y sacarosa 100 mM con el fin de investigar si la interacción proteína-carbohidrato es la principal relacionada con la muerte celular inducida por las galectinas en las células de osteosarcoma (Figura 84). Para esto se preincubaron 75 y 150 µgr/mL de Gal 1 y 3 durante 1 hora a 37 °C en presencia de 100 mM de lactosa y de sacarosa (control) para luego adicionarlas a las células durante 4 h. Los resultados mostraron una inhibición de la acción proapoptótica para ambas galectinas en las dos concentraciones testeadas cuando realizamos los tratamientos en presencia de lactosa 100 mM. Los valores indicaron que el porcentaje de células V(+)/ IP(+) disminuyó de 22% a 8% para 75 µgr/mL y de 44% a 9% para 150 µgr/mL de Gal 1. Para el caso de la Gal 3 los porcentajes de células V(+)/ IP(-) descendieron de 7% a 2% cuando utilizamos 75 µgr/mL de Gal 3 y de 15% a 3% cuando la concentración utilizada de Gal 3 fue 150 µgr/mL en presencia de 100 mM de lactosa. Similar tendencia se observó en el análisis de las células en apoptosis tardía ya que el porcentaje de células V(+)/ IP(+) disminuyeron de 8% a 4% para 75 µgr/mL y de 20% a 6% para 150 µgr/mL de Gal 3 en presencia de lactosa. Estos resultados demuestran la importancia de la interacción Gal-carbohidrato en lo que respecta a su actividad biológica.

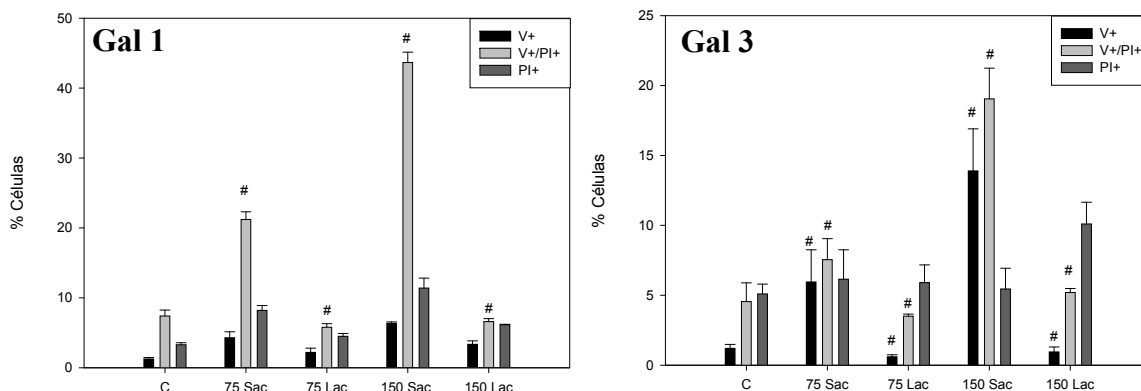


Figura 84 Efectos sobre la apoptosis celular de las Gal 1 y Gal 3 exógenas determinada por citometría de flujo mediante Anexina V/IP. Se pre-incubó 1 h a 37°C las soluciones de 150 µg/mL BSA(Control), 75 y 150 µg/mL Gal 1 y Gal 3 (en medio DMEM con 100 mM de lactosa y 100 mM de sacarosa). Luego de esto las células MG-63 fueron tratadas durante 4 h con 150 µg/mL BSA(Control), 75 y 150 µg/mL Gal 1 y Gal 3 (en presencia de medio DMEM con 100 mM de lactosa) y con 150 µg/mL BSA(Control), 75 y 150 µg/mL Gal 1 y Gal 3 (en presencia de medio DMEM con 100 mM de sacarosa), para luego ser teñidas y analizadas. Los resultados de la gráfica de barras expresan la media ± SEM, n=9, #p<0,01 estadísticamente significativo entre tratamiento con lactosa y sacarosa

3.4.2.2.4.4.5.6 Estudio de la muerte celular programada por una terapia combinada entre VOcris y galectina 1 y 3 exógena.

Luego de haber analizado los efectos proapoptóticos de las Gal 1 y 3 y la inducción de azúcares en superficie por metalodrogas de vanadio en las células de osteosarcoma humano MG-63 se decidió estudiar los efectos combinados de ambas para una terapia antitumoral en osteosarcoma. Para esto se realizó una preincubación de las células por 3 h en presencia de 100 µM de VOcris y luego de esto se las incubó con 75 y 100 µg/mL de Gal 1 y Gal 3. Los resultados evidenciaron un incremento de la muerte celular en el tratamiento combinado por sobre el control cuando el tratamiento fue realizado con la Gal 3. Los valores de células V (+)/ IP(+) del control fueron cercanos al 5%, ese valor ascendió al 19% cuando el tratamiento incluyó al metalofármaco y a 75 µg/mL de Gal 3. Para el tratamiento combinado con 100 µg/mL de Gal 3 esos valores fueron de 16% para el control y 22% para el pre-tratamiento con 100 µM de VOcris, demostrando que los efectos sobre la apoptosis son mayores para la terapia combinada que para el control. Los valores de porcentaje de células V(-)/ IP(+) correspondientes a la fracción de células necróticas se incrementaron de forma significativa con la terapia combinada tanto para 75 como para 100 µg/mL de Gal 3 (Figura 85). Cuando la terapia fue realizada en presencia de 75 y 100 µg/mL de Gal 1 los efectos deletéreos fueron tan grandes que no permitieron evaluar las células con las tinciones realizadas ya que la mayoría de la población celular se encontró como *debris* celular. Este resultado es congruente con los estudios previos realizados de los efectos proapoptóticos de ambas galectinas en los cuales la tendencia demostrada siempre fue un mayor efecto de activación sobre la muerte celular por parte de la Gal 1. Debido a esto se decidió testear una terapia combinada con concentraciones menores de Gal 1, para este caso 25 y 50 µg/mL donde se puedan ver los

efectos de la misma sobre la muerte celular programada. Los resultados de la misma mostraron un efecto sinérgico entre la acción del VOcris y de la Gal 1 sobre la inducción de apoptosis. Los valores de células V(+)/ IP(+) se incrementaron de un 3% a un 14% cuando usamos 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de Gal 1 y de 33% a 49% para el tratamiento con 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de Gal 1. Estos resultados demuestran un efecto sinérgico entre la combinación de los efectos antitumorales del complejo VOcris y las Gal 1 y 3 en una terapia efectiva para células de osteosarcoma humano (Figura 86).

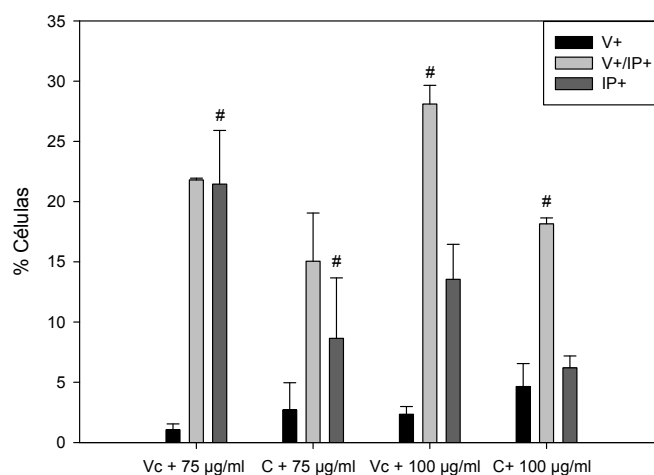


Figura 85 Efectos sobre la apoptosis celular de la terapia combinada entre VOcris y Gal 3 exógena determinada por citometría de flujo mediante Anexina V/ IP. Las células MG-63 fueron pre-incubadas durante 3 h con 100 μM de VOcris en DMEM o con DMEM con 0,5% DMSO (Control) para luego ser incubado por 1 h con 75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de Gal 3. Los plots son representativos de tres experimentos independientes. Los resultados de la gráfica de barras expresan la media \pm SEM, n=9., # p<0,01 estadísticamente significativo entre el pre-tratamiento realizado con el complejo y el pre-tratamiento con medio DMEM solo (control).

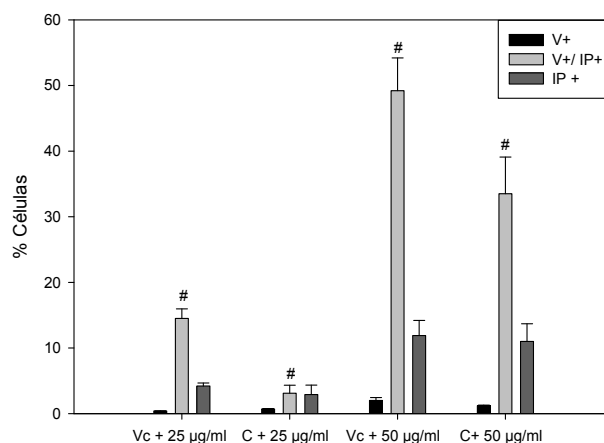


Figura 86 Efectos sobre la apoptosis celular de la terapia combinada entre VOcris y Gal 1 exógena determinada por citometría de flujo mediante Anexina V/ IP. Las células MG-63 fueron pre-incubadas durante 3 h con 100 μM de VOcris en DMEM o con DMEM con 0,5% DMSO (Control) para luego ser incubado por 1 h con 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de Gal 1. Los plots son representativos de tres experimentos independientes. Los resultados de la gráfica de barras expresan la media \pm SEM, n=9., # p<0,01 estadísticamente significativo entre el pre-tratamiento realizado con el complejo y el pre-tratamiento con medio DMEM solo (control).

3.4.2.2.5 Estudios realizados desarrollando matrices poliméricas con aplicación en la terapia antitumoral en la línea celular de Osteosarcoma humano (MG-63)

Con el fin de contribuir al diseño racional de nuevos fármacos y su aplicación en diversas terapias tumorales, es importante tratar de comprender los cambios y los posibles efectos en su acción farmacológica generados por la liberación controlada de estos en comparación con la exposición directa. Es por esto que se evaluó la acción y el efecto de la liberación controlada sobre la capacidad farmacológica antitumoral de VOcris en células de osteosarcoma humano (MG-63) en cultivo. Se estudió la encapsulación y las curvas de cinética de liberación del complejo VOcris en matrices poliméricas de poliuretano biocompatible. El primer ensayo realizado fue el del estudio de la biocompatibilidad por parte de las distintas matrices poliméricas candidatas para su posterior uso en la liberación con las células en cultivo. Se testearon 3 matrices diferentes H12, H12/DEA y IPDI como 3 posibles modelos de liberación, pero se observó que solo la primera (H12) mostró ser biocompatible no generando citotoxicidad en las células de osteosarcoma humano en cultivo (Figura 87). Por su parte la matriz H12/DEA generó una citotoxicidad del 69% dejando solo el 31% de supervivientes y la matriz con IPDI generó un nivel citotóxico del 35% ($p < 0,01$). Estos resultados nos llevaron a seleccionar a la matriz H12 como el modelo a utilizar en la liberación de nuestra droga ya que fue la única de las 3 matrices poliméricas testeadas que mostró ser biocompatible con nuestro sistema de osteoblastos en cultivo.

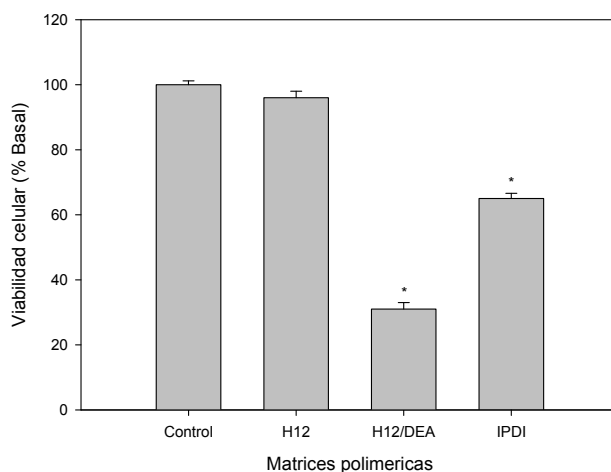


Figura 87 Ensayo de biocompatibilidad de matrices realizado por el método de cristal violeta. Comparación entre los valores observados para la prueba entre las distintas matrices poliméricas (PUH12, PU H12/DEA, PUIPDI) y el nivel basal (medio DMEM sin matriz). Los resultados de la gráfica de barras expresan la media \pm SEM, $n=16$, * $p < 0,01$ estadísticamente significativo con respecto al control.

Posteriormente, se realizaron dos estudios de encapsulamiento y cinética de liberación del complejo probando con dos cantidades iniciales distintas de la droga (16 y 23 mgr) para ver si existe algún efecto en la carga del complejo en la matriz sobre la liberación de este al medio de cultivo. Cuando utilizamos 23 mgr del complejo observamos que la liberación se mantiene de forma controlada y en aumento durante las primeras 24 hs llegando a una concentración aproximada de 250 μ M. Luego de las 24 hs observamos que la liberación se estabiliza ya que el valor registrado a las 72 hs es muy similar al observado a las 24 hs. Por otro lado es importante recalcar que en las primeras 4 horas de liberación el sistema llega a liberar alrededor de 100 μ M (concentración máxima utilizada

para los ensayos de exposición directa). Considerando ese resultado es que se decidió colocar una menor cantidad del complejo dentro de la película para ver si la liberación por parte de esta se daba en menor medida y de esa manera tener valores comparables con el ensayo realizado por exposición directa (0-100 μM). Para ese caso se encapsulo la película con 16 mgr de VOcris y se observó que la liberación es menor y de forma más controlada ya que en las primeras 8 hs libera una cantidad cercana a los 40 μM del complejo, mientras que a 24 hs se llega a una concentración de 51 μM . Nuevamente a partir de esta hora llegamos a una constante en la liberación ya que ese valor se mantiene invariable hasta las 48 hs de tiempo testeado.

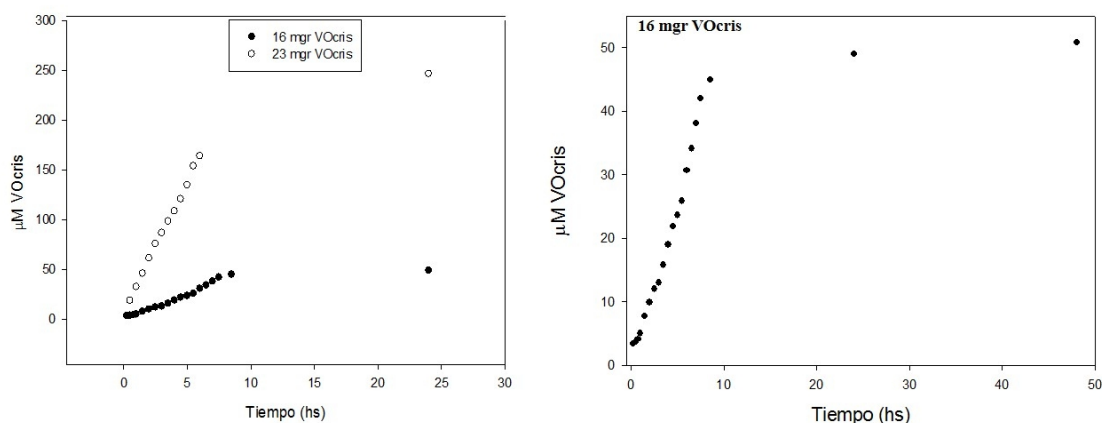


Figura 88 Liberación de la matriz polimérica cargada con 16 y 23 mgr de VOcris en medio DMEM

El modelo de matriz cargada con 16 mgr de complejo fue probado en las células de osteosarcoma humano (MG-63) para ver y comparar si posee mayor, igual o menor efecto antitumoral que la exposición directa. Los resultados del ensayo de viabilidad celular indicaron que a 24 h las películas cargadas con el complejo generaron un 80% de muerte celular en las células de osteosarcoma humano. Estos resultados son muy importantes ya que a través de un sistema de liberación controlada logramos un efecto antitumoral mayor que el logrado por exposición directa en todo el rango de concentraciones testeado (0-100 μM), en el cual a 10 μM tenemos un nivel de muerte del 40 % y en el rango de 25-100 μM una muerte del 70% ($p < 0.01$). Por otro lado resulta importante mencionar que las películas se mantuvieron intactas en cultivo durante el tiempo de la experiencia sin afectar su estructura.

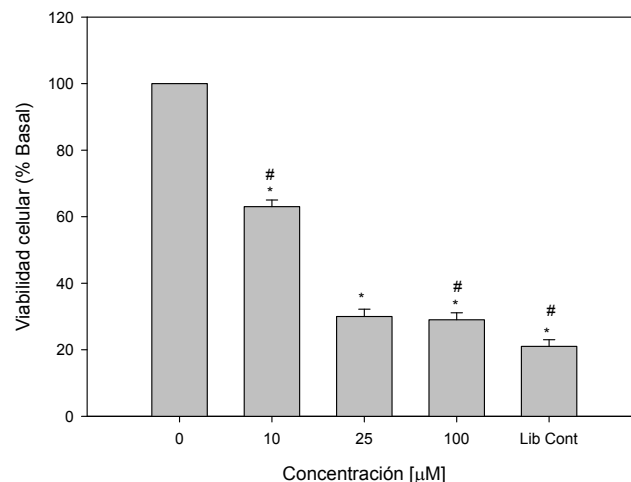


Figura 89 Ensayo de viabilidad celular realizado por el método de cristal violeta. Comparación entre los valores observados para la liberación controlada vs la exposición directa del complejo (10,25 y 100 µM) * ($p<0,01$) diferencia estadísticamente significativa con el control #($p<0,01$) μ diferencia estadísticamente significativa entre muestras.

3.4.2.2.6 Estudios realizados *in vivo*

3.4.2.2.6.1 Generación y establecimiento de un modelo animal murino N:NIH(S) *FoxI^{nu}* xenotransplantado con la línea celular de osteosarcoma humano MG-63.

Con el objetivo principal de evaluar las propiedades farmacológicas de los metalofármacos estudiados previamente en líneas celulares en cultivo (*in vitro*) se procedió a generar un modelo animal xenotransplantado con las células tumorales de osteosarcoma humano (MG-63) para el posterior estudio de la capacidad antitumoral de los complejos metálicos en este sistema *in vivo*.

Con ese objetivo se utilizaron ratones machos y hembras ($n= 5$) de la cepa N:NIH(S) *FoxI^{nu}* inoculados por vía subcutánea con diferentes cantidades de células de la línea MG-63 (2×10^5 , 4×10^5 , 1×10^6 y 2×10^6 células/animal) para testear y conocer la mejor relación de cantidad de células/ crecimiento y desarrollo del tumor.

Los resultados indicaron que para el caso de los machos inoculados con 2×10^5 y 4×10^5 células/ animal, estos no desarrollaron tumores por un lapso de tiempo de 3 meses, por lo cual fueron descartados. A diferencia de estos, aquellos machos inoculados con 1×10^6 y 2×10^6 células/animal crecieron en la misma proporción desarrollando tumores de un volumen igual a $246 \pm 47 \text{ mm}^3$ (tumores de 7 a 8 mm de ancho y largo) al cabo de 60 días (repique cero). Luego de esto se procedió a repicar y propagar el tumor obtenido en estos animales a otros lotes de machos sanos ($n= 5$) con el fin de estudiar y evaluar el establecimiento del tumor obtenido en la cepa N:NIH(S) *FoxI^{nu}*. Los resultados obtenidos mostraron que el establecimiento de la línea de osteosarcoma humano MG-63 en los machos N:NIH(S) *FoxI^{nu}* fue posible ya que se realizaron al menos cuatro pasajes exitosos sucesivos en distintos lotes de animales en los cuales crecieron los tumores desarrollando volúmenes de alrededor de 10 mm de diámetro.

Para el caso de las hembras, los resultados mostraron que aquellos animales inoculados con 2×10^5 y 4×10^5 células/animal desarrollaron pequeños tumores con un volumen de $82 \pm 14 \text{ mm}^3$ (tumores de 5 a 6 mm de ancho y largo) luego de 90 días de inoculados, a diferencia de lo ocurrido con las hembras inoculadas con 1×10^6 y 2×10^6 células/animal en las cuales se desarrollaron tumores con volumen de $517 \pm 89 \text{ mm}^3$ (tumores de 10 a 12 mm de ancho y largo) en un lapso de 45 días.

Posteriormente, todas las muestras colectadas de los repiques de los tumores obtenidos fueron estudiadas desde el punto de vista histopatológico en conjunto con la Cátedra de Patología Especial de la Facultad de Ciencias Veterinarias, UNLP. Los resultados expresados en la figura 90 muestran que para los cortes del tumor (1^{er} repique) proveniente de machos se observa un infiltrado neoplásico bien delimitado de tejidos profundos (10X). Tanto para 40X como 100X se observa en detalle el infiltrado visto para 10 X, con células neoplásicas redondas a ovaladas, con marcado pleomorfismo, macrocariosis, anisocariosis y nucléolos evidentes, así como presencia de figuras mitóticas aberrantes. Para el caso de las hembras observamos infiltrado neoplásico bien delimitado de tejidos profundos con áreas de necrosis (10X) y tanto a 40X como a 100X observamos macrocariosis y anisocariosis. Estos resultados muestran que tanto para machos como para hembras se observan características morfológicas relacionadas a eventos neoplásicos que estarían relacionados con el modelo de osteosarcoma planteado.

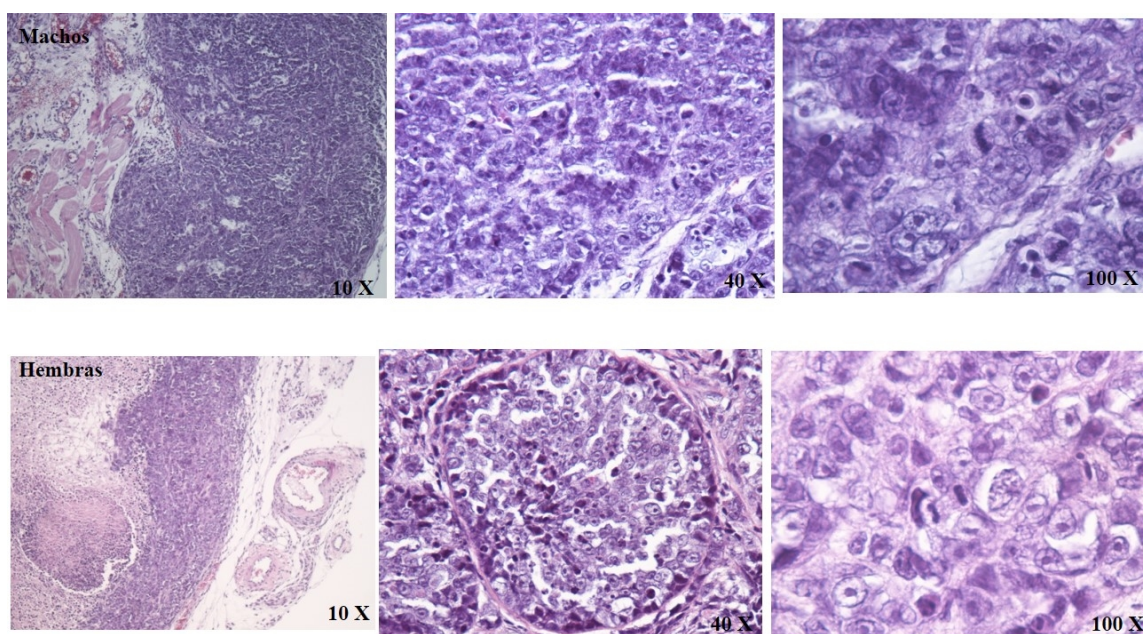


Figura 90 Muestras provenientes del tumor (primer repique) xenotransplantado en ratones y la cepa N:NIH(S) *Fox1tm*. En el panel superior se encuentran aquellas muestras provenientes de machos y en el panel inferior las provenientes de las hembras. Las muestras fueron diseccionadas con bisturí y tenidas con hematoxilina y eosina. Aumento 10X, 40X y 100X.

3.4.2.2.6.2 Evaluación de la capacidad antitumoral del complejo VOcris en ratones inmunodeficientes N:NIH(S) *Fox1tm* inoculados con la línea tumoral de osteosarcoma humano MG-63.

Una vez establecido el modelo tumoral de la línea MG-63 en ratones de la cepa N:NIH(S) *Fox1tm* se decidió evaluar los efectos antitumorales del complejo VOcris (previamente estudiados *in vitro*) en ese sistema *in vivo*. Este compuesto demostró efectos prometedores en los análisis *in vitro* es por esto que se decidió evaluar sus efectos *in vivo* para analizar el posible uso del metalofármaco en una eventual terapia alternativa contra osteosarcoma.

Debido al menor tiempo de desarrollo del tumor obtenido en las hembras, éstas se eligieron para el estudio de la capacidad anticancerígena de la metalodroga en cuestión.

El tratamiento fue realizado durante 11 días consecutivos con dosificaciones cada 24 h e involucró a tres lotes de animales (n=5):

- Grupo control (5% de DMSO)
- Tratamiento con 1000 μM de VOcris
- Tratamiento con 5000 μM de VOcris

La figura 91 muestra los resultados correspondientes al ensayo de evaluación de las propiedades antitumorales de VOcris en el modelo de ratón N:NIH(S) Fox1^{nu} inoculado con células MG-63. Los resultados mostraron que a partir del día 6 de tratamiento el tumor disminuye su volumen de forma estadísticamente significativa con respecto al control (*p<0,01) para ambos tratamientos. A ese mismo día observamos que el tratamiento realizado con la mayor dosis de VOcris (5000 μM) generó una reducción del volumen del tumor mayor que la generada por el tratamiento con 1000 μM de VOcris demostrando el efecto de la concentración sobre la reducción del volumen tumoral (#p<0,01). Para este caso los valores de volumen tumoral (mm^3) fueron de 314 ± 32 , 197 ± 9 y 117 ± 18 , para el control y los tratamientos con 1000 y 5000 μM de VOcris μM , respectivamente. Luego de 9 días de tratamiento se observó que ambas concentraciones continúan con la reducción del tumor en comparación con lo ocurrido para el control, obteniéndose valores de volumen tumoral de 423 ± 52 , 210 ± 38 y 165 ± 28 para el control y los tratamientos con 1000 y 5000 μM de VOcris μM , respectivamente (*p<0,01). La última medición de las dimensiones del tumor fue realizada el día 14 luego de 3 días de la última dosis del fármaco, para ese tiempo observamos nuevamente la reducción tumoral producida por el tratamiento con la dosis más alta de droga (5000 μM) pero ya no vemos diferencias significativas para el tratamiento realizado con 1000 μM de la droga.

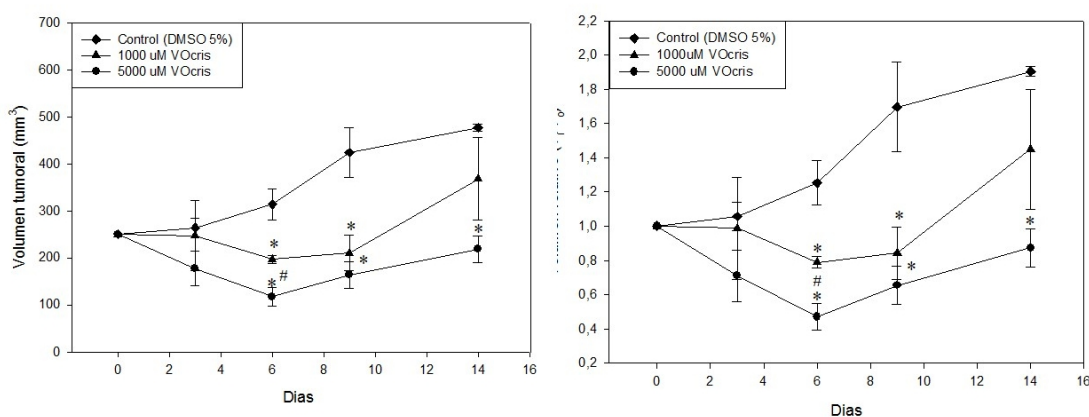


Figura 91 Crecimiento Tumoral. Ratones portadores de tumor, de 250 mm^3 aproximadamente, fueron tratados con 200 μl DMSO 5% (Control), 200 μl VOcris 1000 μM y 200 μl VOcris 5000 μM durante 11 días consecutivos. El tamaño tumoral fue medido cada 3 días. Los valores se expresan como la media de 5 animales \pm SEM. * p < 0,01 con respecto al control, # p < 0,01 entre muestras.

3.4.2.2.6.3 Toxicidad del complejo VOcris

Se corroboró que el complejo VOcris no produjera efectos adversos en el animal midiendo el peso corporal (Pc) final y el peso corporal corregido por el peso que le aporta el tumor al animal (PC-PT). Para ninguno de los dos parámetros evaluados se observaron diferencias significativas entre los distintos lotes demostrando que el complejo VOcris generó un efecto antitumoral deseado ya que redujo el volumen tumoral sin afectar la salud y el bienestar general del animal.

Tabla 7 Efecto de la droga en el crecimiento tumoral y el peso corporal. Como control de toxicidad se evaluó el peso corporal final (PC), el peso corporal corregido (PCPT). Los valores se expresan como la media de 5 animales \pm SEM.

	Peso del animal (Pc)	Peso del tumor (Pt)	Pc-Pt
Control	24,33 \pm 0,88	0,105 \pm 0,021	24,22 \pm 0,859
1000 μM VOcris	24,41 \pm 0,84	0,13 \pm 0,024	24,28 \pm 0,816
5000 μM VOcris	24,25 \pm 0,75	0,09 \pm 0,016	24,16 \pm 0,734

Estudios realizados en la línea celular de Adenocarcinoma colorectal humano (HT-29) y la misma línea transfectada con el gen del *NF κ B* (HT-29 NF κ B-hrGFP)

3.4.2.2.7 Estudios de viabilidad celular

3.4.2.2.7.1 Ensayo del cristal violeta en HT-29

Los resultados observados en la figura 92 evidenciaron que ambos complejos solo tienen efectos a altas concentraciones (75 y 100 μ M), a diferencia de lo observado para las líneas osteoblásticas. El complejo de vanadio y crisina generó una disminución de la viabilidad celular del 25 % a 75 μ M y del 35% a 100 μ M, mientras que el complejo de vanadio y silibinina generó un daño mucho mayor que su par, ya que a 75 μ M indujo una disminución en la viabilidad del 50% y a 100 μ M del 75% (# $p < 0,01$). Por otro lado, no se observaron efectos deletéreos en las concentraciones testeadas por debajo de 75 μ M (5-50 μ M).

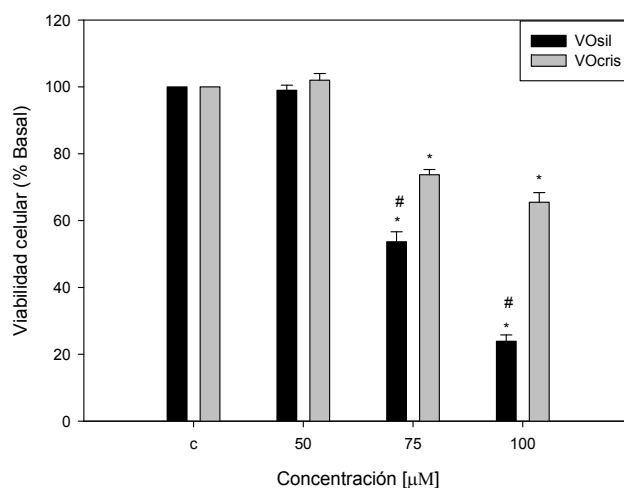


Figura 92 Efecto de los complejos VOsil y VOcris sobre la viabilidad celular de células de adenocarcinoma colorectal HT-29. Los resultados están expresados como el porcentaje del Basal y representan la media \pm SEM de 3 ensayos diferentes (n=16), *($p < 0,01$) significativo con respecto al Basal. #($p < 0,01$) significativo para las concentraciones 75 y 100 μ M entre ambos complejos.

3.4.2.2.7.2 Efectos de VOcris y VOsil sobre la actividad mitocondrial en células HT-29.

En vista a los resultados obtenidos para el ensayo de cristal violeta y con el fin de profundizar los conocimientos de la acción antitumoral de ambos complejos sobre la línea

celular HT-29, se decidió estudiar la citotoxicidad generada por estos sobre la mitocondria.

La figura 93 muestra el efecto de la complejación sobre la actividad antitumoral de los complejos VOsil y VOcris sobre la línea celular HT-29. En esta se evidencia los efectos del metal libre (VO^{+2}), los ligandos (crisina y silibinina) y los complejos (VOcris y VOsil). Los resultados indicaron un mayor efecto sobre la viabilidad celular por parte de los complejos por sobre lo ocurrido con el metal libre y con los ligandos. Para el caso del metal libre solo ejerció un efecto inhibitorio a 100 μM mientras que ambos ligandos no evidenciaron ningún tipo de efecto citotóxico sobre las células. A diferencia de esto ambos complejos fueron activos, generando una pérdida significativa de la actividad mitocondrial tanto a 75 como a 100 μM . Al igual que lo observado en el ensayo de cristal violeta el complejo VOsil tuvo un efecto deletéreo mayor que el VOcris, observándose valores de viabilidad celular del 20% a 100 μM ($p < 0,01$).

Estos resultados demuestran de forma promisoría el beneficio de la complejación del vanadio con los flavonoides con el fin de formar complejos con una actividad biológica mayor.

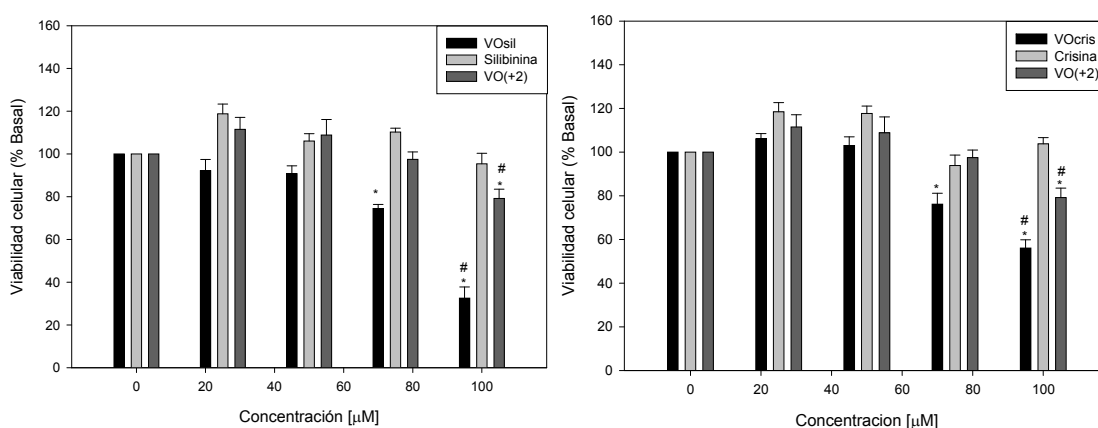


Figura 93 Efecto del metal (VO^{+2}), los ligandos (silibinina y crisina) y los complejos (VOsil y VOcris) sobre la viabilidad celular de células de adenocarcinoma colorectal (HT-29) medida a través de la reducción de la sal de MTT. Los resultados están expresados como el porcentaje del Basal y representan la media \pm SEM de 3 ensayos diferentes ($n=16$), *($p < 0,01$) significativo con respecto al Basal. #($p < 0,01$) significativo para cada concentración testeada entre el complejo, el metal y el ligando.

Para evaluar y comparar el efecto antitumoral de ambos complejos de vanadio sobre las células de adenocarcinoma de colon (HT-29) se testeó el efecto de una droga comercial antitumoral de probada eficacia en diversos tipos de tumores como es el *cis*-Pt. Los resultados de la citotoxicidad evaluados por el método del MTT evidenciaron que la citotoxicidad generada por el *cis*-Pt es considerablemente menor que la producida por ambos complejos de vanadio, especialmente por el VOsil. El *cis*-Pt solo mostró efectos deletéreos a 100 μM siendo estos menores que los generados por el VOcris y el VOsil tanto a 75 como a 100 μM .

Este resultado tiene una gran importancia y relevancia ya que observamos que las nuevas drogas de vanadio con flavonoides propuestas como alternativa de terapia antitumoral a los quimioterapéuticos comerciales como el *cis*-Pt son funcionales y obtienen mejores efectos antiproliferativos.

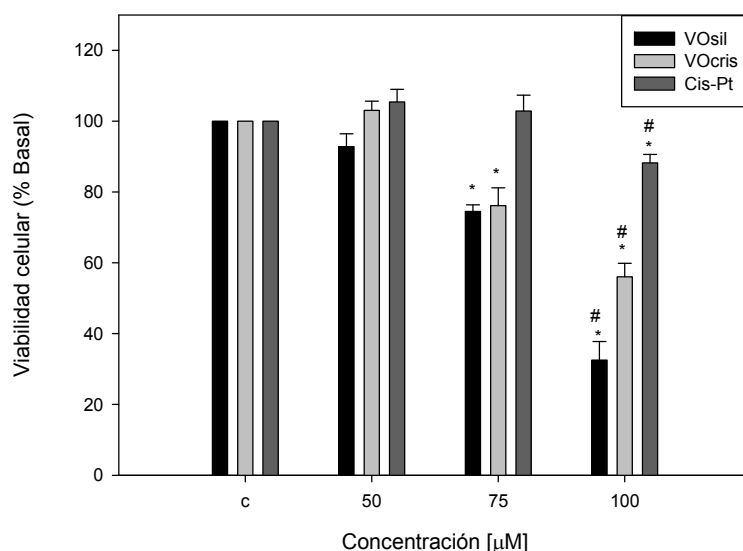


Figura 94 Efecto de los complejos VOsil, VOcris y *cis*-Pt sobre la viabilidad celular de células de adenocarcinoma colorectal HT-29 medidas usando el reactivo de MTT. Los resultados están expresados como el porcentaje del Basal y representan la media \pm SEM de 3 ensayos diferentes (n=16), *(p<0,01) significativo con respecto al Basal. # (p<0,01) significativo para las concentraciones testeadas entre los tres complejos.

3.4.2.2.7.3 Mecanismos de acción

Se procedió a investigar y comparar los posibles mecanismos de acción involucrados en los efectos antitumorales de ambos complejos. Se determinó : el status redox celular (relación GSH/GSSG), la interacción con la htopoisomerasa, el arresto del ciclo celular, los mecanismos de muerte celular por apoptosis, y activación de caspasa-3 y la activación/inhibición de la vía NFκB utilizando las células HT-29 NFκB-hrGFP.

3.4.2.2.7.3.1. Balance redox: Status redox celular. Determinación de glutatión reducido (GSH) y oxidado (GSSG).

Se realizó el estudio del status redox celular midiendo la relación de los niveles de GSH/GSSG. Los resultados se observan en la Figura 95 donde la relación GSH/GSSG se mantuvo igual al control de 25 a 50 µM para ambos complejos. Esta relación disminuyó notablemente al adicionarle 75 y 100 µM de ambos complejos, para el caso del VOsil se vieron los mayores efectos ya q a 100 µM disminuyó a un 40% mientras que para el VOcris ese valor fue de 75% a la misma concentración (p<0,01). Estos resultados indicarían que la acción de los complejos genera un desbalance en las propiedades redox en las células cancerosas de colon como parte de los mecanismos de acción antitumoral utilizados por estos.

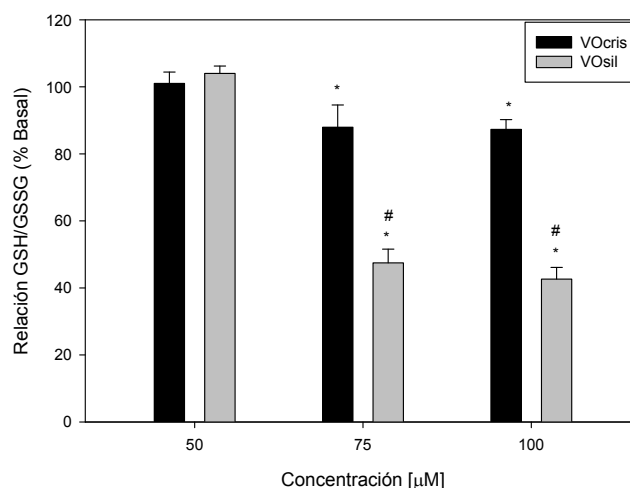


Figura 95 Relación GSH/GSSG en la línea HT-29 en presencia de distintas concentraciones de VOcris y VOsil (50-100 μ M). Los resultados expresan la media \pm SEM de tres ensayos independientes (n=15), *p<0,01 estadísticamente significativo con respecto al control. #p<0,01 estadísticamente significativo para cada concentración testeada entre ambos complejos.

3.4.2.2.7.3.2. Inhibición de la actividad de la enzima topoisomerasa IB

Las topoisomerasas son una familia de enzimas que tienen como principal función controlar la topología del ADN en procesos celulares de vital importancia como la replicación, la transcripción, la recombinación y segregación cromosomal. Las topoisomerasas tipo I utilizan un mecanismo de clivaje de una de las dos hebras de ADN. La topoisomerasa IB tiene un gran interés clínico ya que es uno de los *target* utilizados por diferentes antitumorales para ejercer sus efectos citotóxicos. Es por esto que analizamos la interacción existente entre los complejos de vanadio y la topoisomerasa IB y su actividad sobre un modelo de ADN plasmídico. Para el caso del VOcris, no observamos efectos ni ningún tipo de cambio en la actividad de la topoisomerasa demostrando que este mismo no utilizaría como *target* a esta enzima. Para el caso del complejo VOsil, observamos en la figura 96 como el complejo interfirió en la actividad de relajación del ADN generada por la topoisomerasa IB a partir de los 75 μ M y siendo este efecto cada vez mayor hasta los 300 μ M testeados.

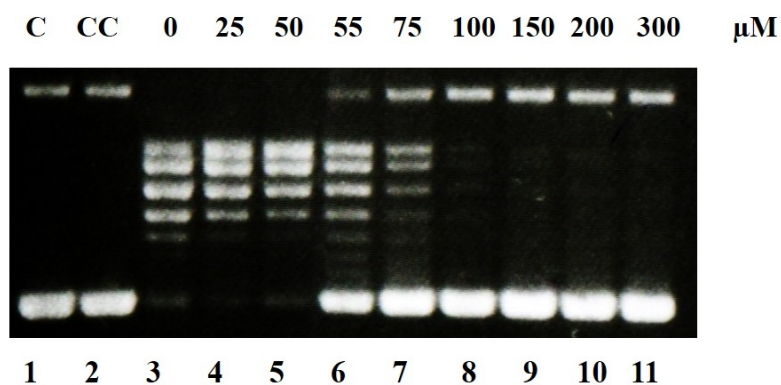


Figura 96 Efectos de VOsil sobre la actividad de la enzima topoisomerasa IB. En el panel superior se observan las concentraciones utilizadas que van de 0-300 μ M. La calle 1 (sustrato: ADN plasmídico pBlue-Script KSII +), la calle 2 (sustrato + VOsil), calle 3-11 (sustrato + enzima con diferentes concentraciones de VOsil). La figura es representativa de tres ensayos independientes.

Para profundizar los estudios sobre el efecto ejercido por el complejo VOsil sobre la actividad enzimática de la topoisomerasa IB, se investigó la acción sobre ésta realizando una preincubación entre la enzima y el complejo (55 μ M) por 5 minutos previos al agregado del ADN plasmídico. Posteriormente se adicionó el sustrato y se realizó un seguimiento a 4 tiempos (1; 7,5; 15 y 30 minutos) de la actividad de la enzima sobre la relajación del ADN. Los resultados observados en la figura 97 demostraron que el efecto inhibitorio generado por VOsil se incrementa con la preincubación del mismo. Por otro lado, se observó en la calle 12 y 13 que el efecto generado por la preincubación de VOsil es reversible, ya que en esas calles comenzamos a visualizar nuevamente actividad enzimática.

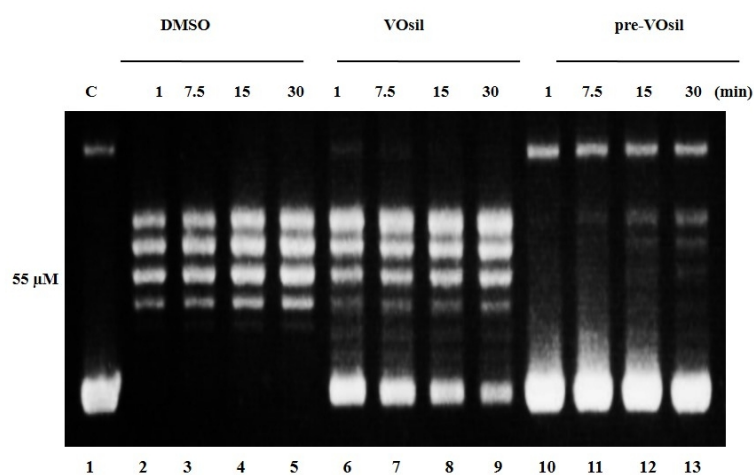


Figura 97 Efectos de VOsil (55 μ M) sobre la actividad de la enzima topoisomerasa IB. La calle 1 (sustrato: ADN plasmídico pBlue-Script KSII +), la calle 2-5 (efecto del control DMSO), calle 6-9 (efecto de VOsil), calle 10-13 (efecto de la pre-incubación por 5 min con 55 μ M de VOsil). La figura es representativa de tres ensayos independientes

Profundizando los estudios de inhibición por parte del complejo sobre la actividad de la topoisomerasa, se realizó un ensayo de movilidad electroforética (EMSA), para visualizar los efectos del complejo sobre la interacción topoisomerasaIB -plásmido (proteína-ADN). Los resultados (Figura 98) indicaron que el VOsil no permite la interacción de la enzima con el sustrato inhibiendo de esa manera su actividad. Este efecto es incrementado cuando se realiza una preincubación con el complejo.

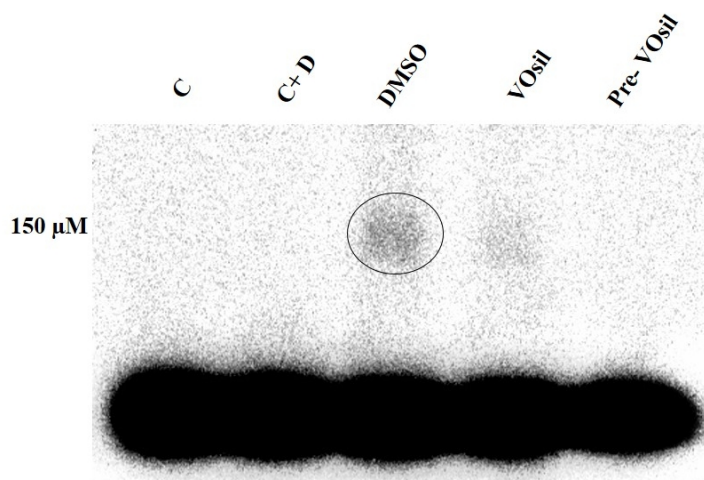


Figura 98 Ensayo de movilidad electroforética (EMSA). Calle 1 (Control solo con ADN plasmidico pBlue-Script KSII +), Calle 2 (ADN en presencia de 0,5% de DMSO), Calle 3 (ADN en presencia de 1% de DMSO + topoisomerasa IB), Calle 4 (ADN + topoisomerasa IB + 150 μ M VOsil), Calle 5 (pre-incubación entre VOsil y la topoisomerasa IB para luego agregar ADN). La figura es representativa de tres ensayos independientes

3.4.2.2.7.3.3. Apoptosis

3.4.2.2.7.3.3.1 Estudio de la externalización del residuo de Fosfatidilserina (PS) por anexina V

Para investigar los diversos pasos de la apoptosis en función del tiempo y de la concentración, se realizaron ensayos de externalización de PS a 6 y 24 h de incubación con VOcris y VOsil. Los resultados indicaron que luego de 6 h de incubación con 100 μ M del complejo VOsil observamos un aumento significativo de células anexina V(+)/IP(-) reconocidas como eventos tempranos de apoptosis y también un marcado incremento de células anexina V(+)/IP(+) indicadas como eventos tardíos de apoptosis. Por otro lado, cuando extendimos el tiempo a 24 h de incubación se observó un aumento significativo de la fracción de células anexina V(+)/IP(+) con respecto a las 6 h, demostrando así el accionar de este complejo con respecto al tiempo de incubación. Para el caso del VOcris no observamos cambios estadísticamente significativos a las concentraciones testeadas (75 y 100 μ M) y a los tiempos de incubación ensayados (6 y 24 h).

Tabla 8 muestra los valores en porcentaje de células en los distintos estadios para el VOsil tanto para 6 como 24 h.

VOsil [μ M]	Annexin V (+)/ IP(-)		Annexin V (+)/ IP (+)	
	6h	24h	6h	24h
0	4%	4%	1%	3%
100	12%	6%	33%	55%

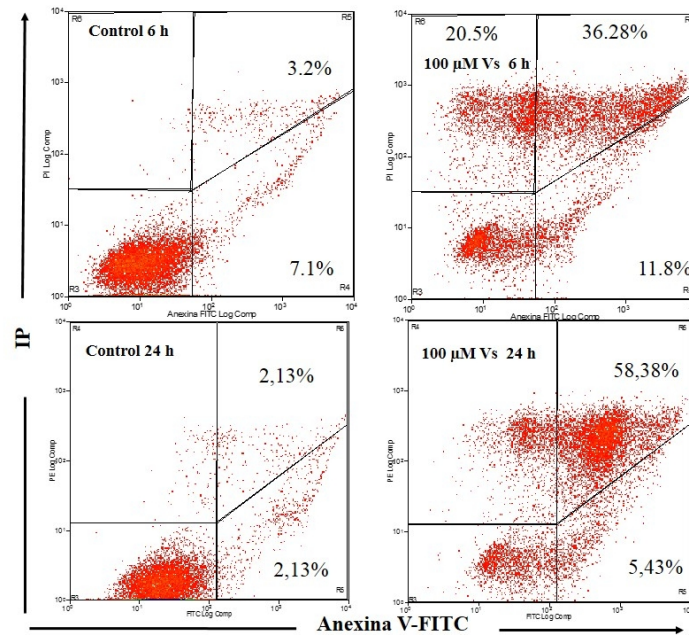


Figura 99 Efectos de VOsil sobre la apoptosis en células HT-29 determinada por citometría de flujo mediante Anexina V/ Ioduro de Propidio (IP). Las células fueron tratadas durante 6 h y 24 h con 0 (basal) y 100 μ M del compuesto. Los plots son representativos de tres experimentos independientes. Los números en los cuadrantes indican el porcentaje de células Anexina V(+)/ IP(-) y Anexina V(+)/IP(+).

Estos resultados indicarían que uno de los posibles mecanismos de acción involucrados en la actividad antitumoral del VOsil sería la inducción de muerte celular programada en las células tumorales de colon (HT-29). Por otro lado, no observamos efectos para el complejo VOcris por lo cual debemos probar alguna otra metodología adicional para la medición de apoptosis para confirmar que el daño generado por el mismo no es por ninguna vía de muerte celular programada.

3.4.2.2.7.3.3.2 Activación de caspasa-3

Luego de haber analizado los resultados de apoptosis (eventos tempranos) obtenidos anteriormente, decidimos realizar el estudio de la activación de caspasa-3, ya que esta tiene un rol clave en los procesos de muerte celular programada. La activación de caspasa-3 se determinó utilizando el kit **Caspasa 3 Assay Kit Pharmingen™, BD** donde las determinaciones fueron realizadas por citometría de flujo.

Los resultados observados en la figura 100 mostraron que luego de 6 h de incubación con VOcris y VOsil solo este último indujo la activación de la caspasa-3 ya que a 100 μ M generó una activación del 250% por sobre la actividad del control ($p < 0,01$).

Estos resultados siguen una tendencia similar a los observados en el ensayo de exposición de PS y confirman la acción proapoptótica por parte del complejo VOsil en la línea de adenocarcinoma colorectal humano HT-29.

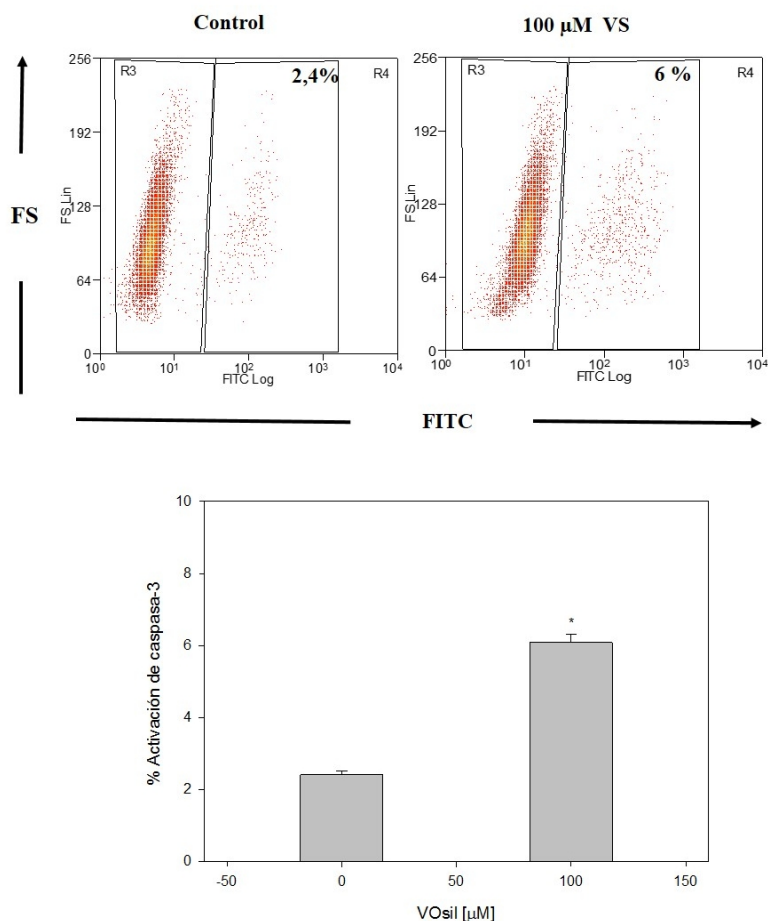


Figura 100 Efectos de VOsil sobre la activación de la caspasa-3 activa en células HT-29. Las células fueron tratadas durante 6 h con 0 (basal) y 100 μM del compuesto y luego se realizaron las mediciones de los niveles de caspasa-3 activa en las células. Los resultados expresan la media \pm SEM de tres ensayos independientes ($n=9$), $*p<0,01$ estadísticamente significativo con respecto al control.

3.4.2.2.7.3.3 Análisis del ciclo celular y fragmentación del ADN

Para complementar los estudios de apoptosis se decidió estudiar la acción de los complejos sobre el ciclo celular debido a que muchos de los compuestos quimioterapéuticos más utilizados tienden a afectar alguna fase del ciclo celular para detener el crecimiento y progreso de las células tumorales.

El arresto del ciclo celular y la progresión de la apoptosis en función de la concentración y del tiempo de incubación fueron llevados a cabo por citometría de flujo.

Los resultados indican que el complejo VOcris generó un arresto en fase G_2/M tanto a 24 como a 48 h. En la figura 101 podemos observar que a 24 h y a 100 μM se produce un incremento de células en la fase G_2/M a un 21% significativo con respecto al control que mostró un 5% ($p<0,01$). Cuando prolongamos el tiempo de exposición a 48 h ese valor se extiende a un 29% de células en fase G_2/M demostrando que el complejo incrementa su acción farmacológica en el tiempo.

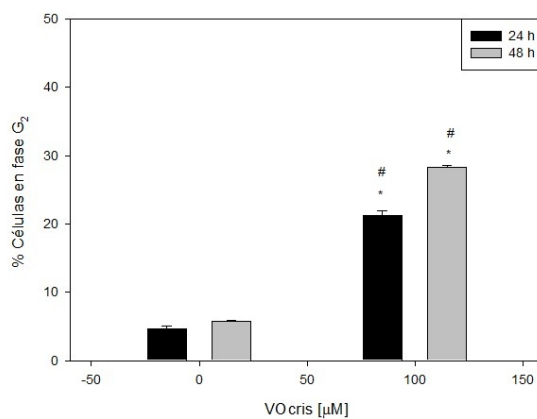
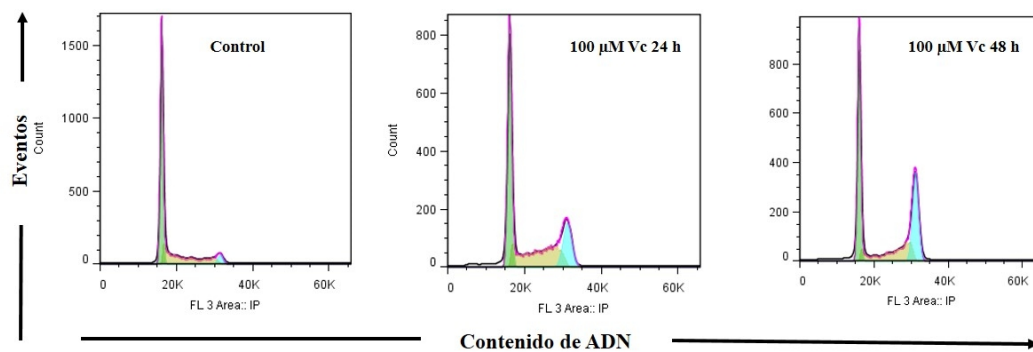


Figura 101 Efectos de VOcris sobre el arresto del ciclo celular. Las células fueron tratadas durante 24 y 48 h con 0 (basal) y 100 μ M del compuesto y luego tenidas con Ioduro de Propidio y analizados con el FlowJo 7.6. Los resultados expresan la media \pm SEM, de tres ensayos independientes (n=9), *p<0,01 estadísticamente significativo con respecto al control. #p<0,01 estadísticamente significativo entre 24 y 48 h.

Para el caso del complejo VOsil observamos que tanto a 24 como a 48 h las células son directamente enviadas a apoptosis, visualizándose un incremento significativo del pico Sub G₁ (aproximadamente del 32 %) que nos indica el grado de fragmentación del ADN. Estos resultados se observan en la figura 102 donde no observamos un efecto respuesta con respecto al tiempo ya que tanto a 24 como a 48 h tenemos valores similares de células en el pico Sub G₁.

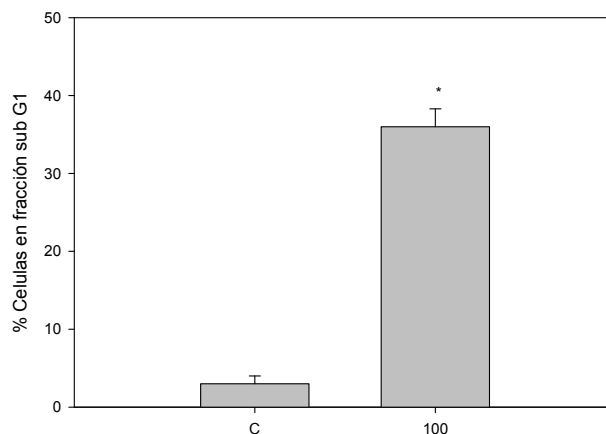


Figura 102 Efectos de VOsil sobre la fragmentación del ADN. Las células fueron tratadas durante 24 h con 0 (basal) y 100 μ M del compuesto y luego tenidas con Ioduro de Propidio y analizados con el FlowJo 7.6. Los resultados expresan la media \pm SEM, n=9., *p<0,01 estadísticamente significativo con respecto al control.

Estos resultados demuestran que el complejo VOsil tiene un efecto citotóxico muy alto y que actúa generando un daño tan grande para la célula lo cual la envía directamente a apoptosis. De lo contrario el complejo VOcris tiene un menor efecto deletéreo por lo cual solo observamos un arresto en la fase G₂/M pero no hay indicios de células con fragmentación nuclear que indiquen presencia de apoptosis.

En su conjunto todos estos análisis complementan y están de acuerdo con lo observado para el ensayo de exposición de fosfatidilserina y el de caspasa-3 que indican una diferencia en la actividad antitumoral de ambos complejos.

3.4.2.2.7.3.4. Estudio de la inhibición de la vía de NF κ B activada por TNF utilizando la línea transfectada HT-29 NF κ B-hrGFP.

El NF- κ B es ampliamente utilizado por las células eucariotas como regulador de los genes que controlan la proliferación celular y la supervivencia celular. Es por esto, que muchos tipos de tumores humanos tienen activado el NF- κ B producido por una desregulación o por una mutación que induce la expresión de los genes que evitan la muerte celular y protegen a la célula, que debería morir por apoptosis. Los defectos en NF- κ B producen una mayor susceptibilidad a la apoptosis que conduce a que haya un aumento en la muerte celular. Esto se debe a que NF- κ B regula genes anti-apoptóticos (sobre todo los TRAF1 y TRAF2) y por tanto, controla la actividad enzimática de las caspasas, que son fundamentales para la mayoría de los procesos apoptóticos (Sheikh y Huang, 2003). La inactivación de NF- κ B puede causar que las células tumorales dejen de proliferar, morir, o que sean más sensibles a la acción de los agentes anti-tumorales, por lo cual el NF- κ B es un objeto muy importante de estudio para la terapia contra el cáncer (Escárcega y col. 2007). Por otra parte, el NF- κ B juega un papel clave en la respuesta inflamatoria haciendo que los métodos de inhibición de señalización de NF- κ B tengan un gran interés terapéutico en cánceres y enfermedades inflamatorias. (Sethi y col. 2008)

Es por esto que se decidió realizar el estudio de la inhibición de la vía de NF κ B activada por TNF en la línea HT-29 de adenocarcinoma colorectal transfectada con el gen NF κ B-hrGFP. Como buscamos ver un efecto molecular sobre la acción de una vía de señalización como es el NF κ B se probaron dos concentraciones a las cuales no se observaron daños citotóxicos como son 25 y 50 μ M.

Para las incubaciones realizadas con 25 μM de los complejos no se observó ningún tipo de efecto. Cuando el tratamiento se realizó con 50 μM se observaron efectos interesantes que se describen a continuación. Los resultados indicaron que el pretratamiento realizado por 2 h con 50 μM de VOsil inhibió un 50% la activación de la vía NF κ B generada por el TNF, mientras que en aquellas células tratadas con 50 μM de VOcris no se observaron cambios en la inhibición. En la figura 103 se observa que cuando activamos la vía de NF κ B por TNF tenemos un 49% de células activadas, este valor disminuye a el 27% cuando preincubamos 2 h con 50 μM de VOsil, demostrando el efecto inhibitorio de ese complejo por la vía NF κ B. Este comportamiento estaría estrechamente relacionado con los efectos proapoptóticos generados por el VOsil en la línea HT-29. Como se mencionó anteriormente existen numerosos reportes que relacionan una activación de la vía NF κ B como una forma de escape a la apoptosis y de la activación de la proliferación celular, en este caso el complejo VOsil estaría involucrado en la inhibición de esa vía aumentando la sensibilidad de las células a la apoptosis que a su vez el mismo compuesto genera, como ya hemos demostrado previamente. Estos resultados son consistentes con todos aquellos obtenidos hasta acá, demostrando el efecto deletéreo y proapoptótico que posee el complejo VOsil por sobre el obtenido para el complejo VOcris.

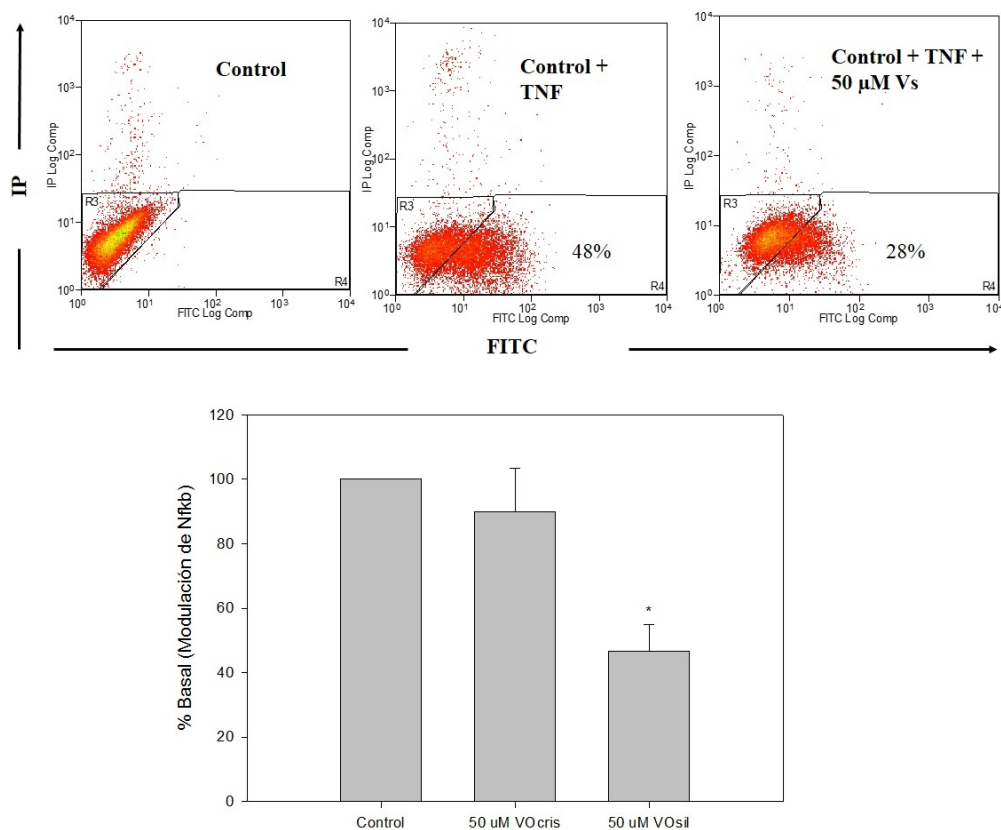


Figura 103 Efectos de los complejos VOsil y VOcris sobre la inhibición de la vía NF κ B activada por TNF utilizando la línea transfectada HT-29 NF κ B-hrGFP. Las células fueron pre-incubadas 2h con 25 y 50 μM de VOcris y VOsil para luego ser activado con TNF por 16 h. Posteriormente las células fueron evaluadas en el citómetro de flujo. Los plots son representativos de tres ensayos independientes. Los resultados expresan la media \pm SEM, de tres ensayos independientes (n=9), *p<0,01 estadísticamente significativo con respecto al control.

4. DISCUSIÓN

“Aprende de quien pone a tu gato el cascabel” Shopping Disco Zen, Lobo suelto Cordero Atado, 1993, Patricio rey y sus redonditos de ricota

Aunque la especulación de que los complejos metálicos podían poseer actividad antitumoral ha existido desde comienzos del siglo XX y la investigación de la acción antitumoral de los compuestos inorgánicos comenzó en la década de 1930, los efectos antineoplásicos de éstos se demostraron recién por primera vez en 1965 (Kieler y col. 1965) mientras que en 1967, el vanadio, evaluado entre otros metales contra tumores murinos espontáneos, resultó ser inactivo (D'jordjevitiz 1995). El descubrimiento de los efectos antitumorales del *cis*-PtCl₂(NH₃)₂ (*cis*-Pt) en el año 1969 hizo que la actividad antitumoral de los metales recibiera una fuerte atención y resurgiera el interés en los estudios de los complejos metálicos tanto de platino como de otros metales. Para el caso del platino, en paralelo con la comercialización del *cis*-Pt en los años 1978 y 1979 en EE UU y Gran Bretaña surgieron estudios del mismo como radiosensibilizante en conjunto con radioterapias (Richmond y Powers, 1976). Además se comenzó con el estudio y el desarrollo de nuevos fármacos basados en platino como el carboplatino y el oxaliplatino durante la década del 80 con el fin de potenciar los efectos antitumorales del *cis*-Pt, sus propiedades químicas como la solubilidad, y a su vez evitar sus efectos secundarios y la resistencia de ciertos tipos de tumores (Weiss y col. 1984, Calvert y col. 1984).

Para el caso del vanadio surgieron los descubrimientos de English y col. (1983), en el rol del metal como un inhibidor de la diferenciación terminal de células de eritroleucemia murina y por Thompson y col (1984), en la inhibición de la carcinogénesis mamaria inducida químicamente mediante el uso de sulfato de vanadilo, mostrando evidencias sobre el potencial del vanadio como agente quimioprotector. Por otro lado, se destacan los efectos farmacológicos de los compuestos de vanadio como agentes insulino miméticos (Tsiani y Fantus 1997; Goldwasser y col. 2000, Peters y col. 2003, Mehdi y Srivastava 2005, Thompson y Orvig 2006) y la reducción de la hiperlipidemia e hipertensión (Brichard y Henquin 1995), revelan el potencial terapéutico de estos compuestos. La información y evidencia acumulada de experimentos llevados a cabo en los últimos 25 años, sugieren que el vanadio podría ser considerado como un representante de una nueva clase de agentes antitumorales metálicos no derivados del platino.

Se ha propuesto que los mecanismos antitumorales ejercidos por el vanadio incluyen la generación de estrés oxidativo, el desbalance del estado redox, la inhibición de tirosina fosfatasas y cambios en las proteínas del citoesqueleto (Evangelou 2002).

Los ligandos pueden potenciar las propiedades fisicoquímicas de los metales a los que se unen y también esa interacción puede modular la propia acción de los ligandos, lo cual es de particular interés ya que las cualidades esperadas para un agente farmacéutico ideal incluyen estabilidad, biodisponibilidad y escasos o nulos efectos colaterales adversos. En cuanto a la biodisponibilidad y a la entrada de este metal a la célula se conoce muy poco ya que no se ha descrito un mecanismo de transporte activo en células de mamíferos

(Nielsen 1997), a diferencia de lo que ocurre para ciertos metales esenciales como cobre, zinc o hierro (Rucker y col. 1994).

En el presente trabajo de tesis doctoral se estudiaron los posibles mecanismos de acción que contribuyen a los efectos antitumorales de metalofármacos de cobre, platino y vanadio en sistemas *in vitro* e *in vivo*. Los ligandos empleados comprenden familias de flavonoides (crisina y silibinina) e quinolinas y derivados, estructuras multidentadas (oxodiacetato) de interés como modelo de las interacciones con ligandos naturales multidentados propios de la estructura celular y ligandos heterociclos con propiedades intercalantes del ADN.

4.1 Heteropolioxometalatos (HPOMs) con cobre: PW_9Cu

Uno de los desarrollos más interesantes en este contexto es la aplicación directa de la Química Inorgánica para la solución de problemas sociales. Es por esto que en esta tesis se avanzó en el estudio de las propiedades biológicas de los HPOMs por ser moléculas grandes y multifuncionales. Los polioxometalatos son *clusters* de metales de transición (usualmente de las especies d^0 V(V), Nb(V), Ta(V), Mo(VI), y W(VI)) puenteados por aniones oxigenados (Pope, 1983). El número de polioxometalatos reportados muestra un marcado crecimiento en la literatura debido a sus propiedades como catalizadores para diversos procesos químicos y a sus propiedades biológicas con potencial aplicación en medicina (Pope y Müller, 1991). Químicamente se reconocen dos grandes familias de polioxometalatos: los isopolioxometalatos o isopolianiones que contienen sólo cationes metálicos d^0 y aniones óxidos, y los heteropolioxometalatos o heteropolianiones que contienen uno o más heteroátomos en adición a los otros iones. Dado que los HPOMs son mucho más abundantes que los POMs, las aplicaciones de estos compuestos en medicina han sido más exploradas para el grupo de los HPOMs. Es por esto que en esta tesis se estudió la actividad antitumoral de un HPOM con cobre sobre líneas osteoblásticas en cultivo. El cobre juega un rol fundamental en la bioquímica de todos los organismos aeróbicos ya que por sus características redox participa de reacciones con transferencia de electrones formando parte de un número de enzimas críticas para la biosíntesis del tejido conectivo y defensa antioxidante. Además, el cobre y sus complejos tienen interesantes propiedades antiinflamatorias, por lo tanto actúan también como agentes antitumorales (Macias y col. 2003).

Los resultados sobre la viabilidad celular de células MG-63 por parte de los HPOMs con cobre, manganeso, zinc y cobalto mostraron que el compuesto con cobre(II) generó mayores efectos deletéreos en todo el rango de concentración comparados con sus pares de Zn y Co(II) los cuales generaron efectos inhibitorios sobre la viabilidad celular solo a concentraciones altas (75 y 100 μM). Para el caso del compuesto derivado de manganeso no mostró efectos inhibitorios sobre la viabilidad celular. Teniendo en cuenta estos resultados se decidió elegir al HPOM con cobre(II) denominado " PW_9Cu " para continuar con el detallado estudio de la citotoxicidad y de los mecanismos de acción involucrados en su acción antitumoral. Es por esto que se evaluaron los efectos del compuesto PW_9Cu sobre otras líneas osteoblásticas como la línea tumoral de osteosarcoma de rata (UMR106) y la línea de fenotipo normal osteoblástica (MC3T3-E1). Los resultados evidenciaron un efecto inhibitorio del compuesto en el rango de concentraciones de 50-100 μM para las UMR106 y de 75-100 μM para las MC3T3-E1. Comparando estos resultados con los obtenidos para el efecto sobre la línea humana de osteosarcoma podemos decir que el efecto deletéreo del compuesto sobre las tres líneas osteoblásticas testeadas sigue el siguiente patrón MC3T3-E1 <UMR106< MG-63, con los valores de

IC₅₀ correspondientes (92, 81 y 23 μM). Estos resultados en su conjunto nos indicarían que la acción diferencial del PW₉Cu sobre las líneas tumorales osteoblásticas por sobre la de fenotipo normal lo convierte en un interesante y potencial candidato antitumoral.

En función de estos resultados se evaluaron y compararon los efectos del compuesto de cobre con los del *cis*-Pt en las células de osteosarcoma humano. Los mismos evidenciaron un mayor efecto inhibitorio por parte del PW₉Cu por sobre los efectos del *cis*-Pt en las concentraciones que van de 20 a 25 μM principalmente. Del análisis de los valores del IC₅₀ se desprende que el compuesto PW₉Cu posee mejores efectos antitumorales que el *cis*-Pt en la línea celular MG-63 (IC₅₀ PW₉Cu = 22 μM vs IC₅₀ *cis*-Pt = 39 μM). Para la confirmación de los resultados observados sobre la viabilidad celular por métodos colorimétricos se realizó el estudio sobre los cambios producidos sobre la morfología celular. En estos se pudieron observar los efectos del PW₉Cu a 25 y 100 μM luego de 6 y 24 h de incubación. Los resultados indicaron que para 25 μM se vio una ligera deformación de la estructura nuclear mientras que a 100 μM observamos profundas alteraciones en la estructura celular en la cual el citoplasma se encuentra colapsado y el núcleo condensado y fragmentado. Luego de 24 h de incubación se observó un alto nivel de fragmentación y condensación nuclear en todas las células. Estos resultados demuestran el efecto de la concentración y el tiempo con respecto a los efectos deletéreos generados por el PW₉Cu sobre la morfología celular. Luego de verificar la acción del metalocompuesto sobre las células se investigaron los posibles mecanismos de acción involucrados con su actividad citotóxica en células MG-63. El daño oxidativo ha sido reportado como uno de los principales factores relacionados con los daños celulares producidos por otros compuestos metálicos (Lee y col. 2012).

Es por esto que para entender uno de los posibles mecanismos de acción involucrados fueron evaluados los efectos del compuesto sobre la generación de ROS y el desbalance redox evaluando el par GSH/GSSG.

Los resultados evidenciaron un incremento en los niveles de ROS a partir de 25 μM con una tendencia dosis-respuesta donde se registraron valores de ROS del 345% para la concentración más alta testada. Además, se observó que la relación GSH/GSSG disminuye en el mismo rango (25-100 μM) con una tendencia similar. Al igual que para el ensayo de ROS observamos un menor efecto a 25 que a 100 μM del compuesto evidenciándose la acción diferencial con respecto a la concentración. Para comprobar y chequear la importancia como mecanismos de acción por parte del PW₉Cu en la generación de ROS y la depleción de los niveles de GSH, se testeó la viabilidad celular en presencia de *scavengers* (mezcla de vitaminas C y E 50 μM de cada una) y de GSH (1mM). Los resultados mostraron una tendencia de recuperación de la viabilidad celular similar para ambos ensayos. En estos observamos que a 25 μM el aumento de viabilidad celular llega hasta valores cercanos al control, los cuales son consistentes con lo observado en la generación de ROS y de GSH/GSSG (en la cual a 25 μM se generó menor inducción de ROS y menor desbalance GSH/GSSG que para 100 μM). Estos resultados demuestran el posible rol principal que tienen la generación de ROS y el consecuente desbalance redox en la actividad antitumoral de este compuesto. Resultados similares fueron reportados para otras metalodrogas de cobre sobre células en cultivo (Bisceglie y col. 2012, Nagai y col. 2012).

Otro mecanismo involucrado con la generación del stress oxidativo es el arresto del ciclo celular. La célula prolifera y crece siguiendo lo que indican las fases del ciclo celular el cual esta cuidadosamente regulado por diferentes puntos de control (Sherr, 2000). Uno de los puntos emergentes en lo que respecta al descubrimiento de fármacos es el desarrollo de agentes que frenen o arresten la progresión del ciclo celular teniendo como blancos los puntos del control del mismo. Es por esto que se analizaron los efectos del

PW₉Cu sobre el arresto del ciclo celular en células MG-63. Los resultados evidenciaron un arresto del ciclo celular en fase G₂/M luego de 24 y 48 h de incubación para 25 μM, observándose una mayor fracción de células arrestadas luego de 48 h. Los resultados observados para el tratamiento con 100 μM mostraron que el compuesto deja de arrestar el ciclo celular para enviar las células directamente a apoptosis, la cual fue evaluada por la presencia del pico sub-G₁ luego de 24 y 48 h de incubación. Estos resultados demuestran que el compuesto activa dos mecanismos de acción diferentes dependiendo de la concentración utilizada. Para el caso de 25 μM observamos que el PW₉Cu generó arresto del ciclo celular en fase G₂/M sin inducir la apoptosis mientras que para 100 μM el compuesto envió las células directamente a apoptosis (sin arresto celular previo) observadas a través de la fragmentación del ADN producido. Estos resultados son coincidentes con lo observado para la generación de ROS y el desbalance redox en el cual a 25 μM se observaron valores mucho menores en comparación con lo observado luego de 100 μM, lo cual justificaría la agresividad del mecanismo de acción final ejercido por el metalofármaco para cada concentración. Diferentes estudios realizados con dos polioxomolibdatos en células gástricas y de páncreas evidenciaron un aumento de la apoptosis en función de la concentración de los HPOMs (Mitsui y col. 2006, Ogata y col. 2008). Además, recientes estudios demostraron que distintos HPOMs derivados de vanadio como los decavanadatos generaron arresto del ciclo celular en fase S sobre líneas tumorales de hígado y ovario (Zhai y col. 2009).

Para completar los estudios de apoptosis y reforzar la hipótesis planteada sobre un mecanismo de acción dependiente de la concentración del PW₉Cu se analizó la apoptosis por otro método de estudio. Un indicador importante de las etapas tempranas de la apoptosis es la externalización del fosfolípido fosfatidilserina a la cara externa de la membrana plasmática, el cual es cuantificado utilizando anexina acoplado a un fluoróforo (fluoresceína para este caso). Los resultados del mismo indicaron que el PW₉Cu indujo la apoptosis (temprana y tardía) solo cuando utilizamos 100 μM del mismo mientras no hubo inducción de la apoptosis cuando utilizamos 25 μM del compuesto, confirmando los resultados observados anteriormente y reforzando la hipótesis de la utilización de un mecanismo de acción o de otro en función de la concentración utilizada.

Por último y para confirmar esta idea planteada se evaluó el efecto del PW₉Cu sobre la disipación del potencial de membrana mitocondrial (PMM). La mitocondria es una organela de vital importancia en la regulación de los mecanismos apoptóticos es por esto que la disipación del PMM conlleva a la célula a la muerte celular por apoptosis o necrosis (Mayer y Oberbauer. 2003). Los resultados mostraron una disminución del PMM significativo luego de 6 y 24 h de incubación con 100 μM de PW₉Cu mientras que no se observaron alteraciones del PMM cuando se realizó el mismo ensayo pero utilizando 25 μM de PW₉Cu. Estos resultados demuestran y confirman que solo se indujo una disipación del PMM conllevando a la apoptosis para el tratamiento con 100 μM de la droga mientras no se observaron esos efectos cuando usamos 25 μM, reforzando la idea de la utilización de dos mecanismos distintos acordes a cada concentración de PW₉Cu.

Luego de evaluar los mecanismos de acción por parte del PW₉Cu se decidió investigar los efectos de este sobre la expresión de unas proteínas que poseen un rol clave en el desarrollo del fenotipo tumoral celular como son las galectinas. Estas son una familia de proteínas extremadamente conservadas que unen residuos β-galactosil y ejercen acciones biológicas diferenciales en distintos microambientes. (Wada y Makino, 2001).

Para este tipo de análisis molecular se utilizaron tiempos cortos de incubación (3 y 6 h) y concentraciones más altas (100, 250 y 500 μM) en las cuales no observamos daños citotóxicos. Los resultados demostraron una disminución en los niveles de expresión de ARNm de Gal 3 en las tres concentraciones testeadas mientras que solo se evidenció ese

cambio para Gal 1 cuando incubamos con 500 μM del compuesto. Para 6 h los resultados mostraron una tendencia distinta ya que si bien disminuyeron en la expresión de ambas galectinas para el tratamiento con 100 μM de PW_9Cu , se observó un incremento significativo de la expresión para ambas galectinas a 500 μM . Por otro lado, los cambios en la expresión de ambas proteínas fueron analizadas por western blot. Estos resultados indicaron que luego de 3 h de incubación se observó una disminución de los niveles de ambas galectinas para 100 y 250 μM mientras que no se observaron efectos para 500 μM de PW_9Cu . Para 6 h se evidenció un resultado similar con la diferencia de que para 500 μM existe un aumento significativo en la expresión de Gal 1. Estos resultados están en congruencia con lo observado para la expresión de los mensajeros para ambas galectinas, demostrando cierto nivel de correlación entre los cambios en la expresión del ARNm y la proteína. En el análisis global de estos resultados se desprende que la expresión de ambas galectinas es regulada de forma negativa a concentraciones bajas e intermedias (100 y 250 μM) mientras que a concentraciones altas (500 μM) ambas galectinas son sobre reguladas. Esto puede deberse a que a concentraciones bajas e intermedias (100 y 250 μM) el quimioterapéutico genera una disminución de los niveles de Gal 1 y Gal 3 con reconocida actividad anti-apoptótica intracelular en muchos tejidos para contrarrestar los efectos de estas sobre la progresión y agresividad del tumor como ha sido reportado previamente por Miao y col 2014. Cuando utilizamos concentraciones altas del metalocompuesto (500 μM) en las cuales comienza a generar niveles de citotoxicidad sobre la célula, el incremento en la expresión de Gal 1 podría deberse de alguna manera a un mecanismo de supervivencia celular frente al ataque del PW_9Cu . Otro aspecto importante para recalcar es que estos cambios de expresión para ambas proteínas por inducción con el metalocompuesto no afectaron su secreción al medio extracelular. De todos modos eso puede deberse entre otras cosas a q la galectina secretada se vuelva a pegar a la célula para cumplir funciones vitales manteniendo un nivel constante que genere un fenómeno regulatorio desde el punto de vista biológico dentro de la célula. Los resultados obtenidos en esta tesis demuestran que estos compuestos poseen potencial actividad farmacológica antitumoral además de las ya conocidas funciones como antiretroviral y como catalizador en la industria química. La principal controversia de los POMs y HPOMs para su aplicación en Medicina es que estos no son compuestos orgánicos a diferencia de la mayoría de los fármacos que dominan la industria farmacéutica que son moléculas orgánicas de bajo peso molecular. A contrapunto con esto, los medicamentos basados en POMs son más económicos y más sencillos de producir en gran escala, en comparación con los compuestos orgánicos, y por ello su desarrollo sería un impacto importante para la industria farmacéutica nacional. Este punto es de gran relevancia a considerar en países en desarrollo y la atención de sus requerimientos farmacéuticos en la cual la aplicación directa de la Química Inorgánica podría solucionar ciertos problemas sociales.

4.2 Complejos de platino: CR-163 y CR 175

Las hidroxiquinolinas son un grupo de ligandos muy interesantes por su variada actividad biológica y por su gran versatilidad a la hora de coordinar con metales. Dentro del espectro de actividades biológicas poseen una marcada actividad antitumoral la cual ha sido reportada para sistemas *in vitro* como *in vivo*. Debido a estas propiedades existen una gran cantidad y variedad de complejos metálicos reportados en la literatura utilizando este tipo de ligandos o derivados de los mismos (Prachayasittikul y col. 2013).

La síntesis de los complejos de platino(II) con este tipo de ligandos fue previamente reportados por Martin-Santos y col. 2013. La evaluación de los mismos desde el punto de

vista biológico se fundamenta en probar compuestos análogos al *cis*-Pt para potenciar los efectos antitumorales ya conocidos y a su vez tratar de disminuir la resistencia y los efectos adversos del mismo. Dentro de este análisis cabe destacar que se evaluaron los efectos sobre la viabilidad celular, la generación de ROS y la apoptosis.

Los resultados sobre la viabilidad celular en células de osteosarcoma humano MG-63 mostraron una disminución de la misma por ambos complejos mostrando un efecto deletéreo dependiente de la concentración a partir de los 5 μM para CR-175, a diferencia de lo observado para el CR-163 donde los efectos citotóxicos comienzan a partir de 25 μM . Comparando estos resultados con los valores obtenidos para el *cis*-Pt se pudo observar que el complejo CR-175 posee efectos antitumorales mayores en las concentraciones que van de 5-50 μM , mientras que en el rango de 50-100 μM los efectos son similares. Comparando la actividad del CR-163 con el *cis*-Pt, este último posee mayor actividad en todo el rango de concentraciones testeado. Observando los valores de IC_{50} para los tres podemos concluir en que el complejo con mayor actividad es el CR-175 ya que posee un valor 10 veces menor que el *cis*-Pt ($\text{IC}_{50 \text{ CR-175}} = 4 \mu\text{M}$, $\text{IC}_{50 \text{ CR-163}} = 46 \mu\text{M}$, $\text{IC}_{50 \text{ cis-Pt}} = 39 \mu\text{M}$). Este resultado es de gran importancia ya que el complejo CR-175 posee efectos antitumorales mayores que el *cis*-Pt el cual es un complejo de referencia aprobado para su uso en clínica. Por otro lado, es importante mencionar que la solubilidad del CR-175 fue mucho mayor que la del CR-163 lo cual facilita la disolución en los medios acuosos para trabajar con las células en cultivo.

Teniendo en cuenta estos resultados y siguiendo los mecanismos de acción e interacción con el ADN por parte del *cis*-Pt se decidió a estudiar los efectos de ambos complejos sobre el ADN de células de osteosarcoma humano. Los resultados evidenciaron un mayor efecto genotóxico por parte de CR-175 a bajas concentraciones (1 μM), mientras que a concentraciones más altas (2,5-5 μM) los efectos genotóxicos del CR-163 comenzaron a evidenciarse. Estos resultados se pueden explicar teniendo en cuenta los mayores efectos citotóxicos generados por parte del CR-175 a partir de 5 μM los cuales enmascaran los efectos genotóxicos. Además, se demostró la actividad nucleasa del complejo CR-175 en un modelo de ADN plasmídico. La interacción de distintos compuestos derivados de platino con el ADN demuestra que el mismo es uno de los blancos más reportados y relacionados con sus propiedades antitumorales (Ahmad 2010, Baruah y col. 2004).

Debido a los resultados anteriores se decidió evaluar los efectos del complejo CR-175 sobre la inducción de ROS y la apoptosis sobre las células de osteosarcoma humano.

Diversos reportes demuestran la relación de la citotoxicidad encontrada para complejos de platino y la generación de ROS junto con el desbalance del status redox celular (Gegotek y col. 2013, Jarocka y col. 2013).

Los resultados mostraron que el complejo CR-175 incrementó la generación de ROS a partir de 25 μM , observándose un efecto dosis-respuesta. Este resultado está relacionado directamente con los niveles de citotoxicidad generados e implicaría a la generación de ROS como un posible mecanismo de acción.

Para evaluar si existe una correlación entre la generación de citotoxicidad, ROS y la muerte celular programada (apoptosis) se evaluaron los efectos sobre la misma utilizando la tinción anexina V/IP. Los resultados evidenciaron un incremento tanto de las fracciones tempranas como tardías de apoptosis para los tratamientos realizados con 10 y 50 μM observándose una correlación entre la posible generación de ROS, la citotoxicidad generada y la muerte celular por apoptosis.

La mitocondria es una de las organelas más importantes en la regulación de la muerte celular por apoptosis (Herr y Debatin, 2001; Grebenova y col. 2003). Las mitocondrias de las células normales bombean H^+ desde la matriz hacia el exterior de membrana interna durante la transferencia de electrones en la cadena respiratoria. De tal forma, puede

generarse un gradiente electroquímico entre el interior y exterior de la membrana mitocondrial, debido a un gradiente de concentración de H^+ que genera un potencial de membrana. Este potencial de membrana mantiene la integridad y función de las mitocondrias. Cuando un estímulo genera cambios en la mitocondria como disipación del potencial de membrana, disminución del ATP producido o la reducción de la transcripción y transducción, esos eventos pueden resultar en apoptosis o necrosis (Mayer y Oberbauer 2003). Existen observaciones previas que indican que el platino se acumula en las mitocondrias intactas, disipando el potencial de membrana mitocondrial e induciendo de esta manera diversos fenómenos relacionados con la muerte celular programada (van Rijt y col. 2014, Dalla via y col. 2013, Onambebe y col. 2010).

En la mayoría de las células, la disrupción del potencial de membrana mitocondrial (PMM) usualmente precede a la degradación del ADN (Marchetti y col. 1996). Los cambios en la función de la membrana interna de la mitocondria incrementan la permeabilidad de la membrana externa (la mitocondria es una organela de doble membrana con distintas permeabilidades) promoviendo la liberación de factores apoptogénicos como el citocromo c (Kim y col. 2002). Se han propuesto diversos métodos para estimar las modificaciones del PMM, uno de ellos es el empleo de sondas lipofílicas (Darzynkiewicz y col. 1982) las cuales, de acuerdo a la ecuación de Nerst son secuestradas en la matriz mitocondrial. Entre éstas, la rodamina 123 es una de las más usadas por su baja toxicidad (Lopez-Mediavilla y col. 1995).

En las células de osteosarcoma se encontró que el tratamiento con distintas concentraciones de CR-175 indujo la pérdida del PMM con 50 μM del compuesto.

Con todos los resultados en su conjunto podríamos decir que el complejo CR-175 es el que mostró mejores propiedades antitumorales de los testeados y ejercería su actividad citotóxica mediante la alteración de propiedades fundamentales de las mitocondrias a través de la generación de ROS y la inducción de muerte celular programada. De esto surge que el mismo es un buen candidato para ser evaluado en algún modelo *in vivo* de estudio que nos permita abarcar aspectos de toxicidad y eficacia tumoral en un modelo de estudio más completo. Por otro lado, cabe destacar que la síntesis de este tipo de compuestos suele ser bastante laboriosa y con rendimientos bajos por lo cual la obtención del mismo no es un proceso sencillo. Además, los costos de producción y síntesis de los mismos son muchos más altos que los complejos de vanadio los cuales proponemos en esta tesis como una futura y posible terapia alternativa frente a osteosarcoma. Este último es un dato de gran relevancia a la hora de considerar la generación de nuevos fármacos, ya que a la hora de continuar con los estudios en fase clínica la evaluación económica es un aspecto a tener en cuenta.

4.3 Complejos de Vanadio(V): $VO(NH_2O)_2(met)$ y con valina $[VO(NH_2O)_2(val)]$.

Dentro de los ligandos importantes dentro de la química medicinal se encuentran aquellos con la posibilidad de formar quelatos y donar oxígenos. Entre estos ligandos se encuentra la hidroxilamina H_2NOH que es capaz de unirse a diferentes metales para formar complejos.

Diferentes complejos metálicos utilizando al ligando hidroxilamido NH_2O^- fueron sintetizados, caracterizados y reportados en la literatura (Crans, 1998).

La síntesis y caracterización de ambos complejos fue realizada por Piro y col. 2009.

Los estudios biológicos realizados para estos complejos y la comparación de su actividad antitumoral incluyen estudios de viabilidad celular, genotoxicidad e inducción de stress oxidativo.

Los resultados de los efectos de ambos complejos sobre la viabilidad celular indicaron que el $[\text{VO}(\text{NH}_2\text{O})_2(\text{met})]$ es el más potente como inhibidor de la viabilidad celular en ambas líneas celulares (MC3T3-E1 y UMR106) observándose un mayor efecto deletéreo sobre la línea de fenotipo normal que en la tumoral. Por otro lado, el complejo $[\text{VO}(\text{NH}_2\text{O})_2(\text{val})]$ mostró menores efectos deletéreos en ambas líneas celulares pero nuevamente se dio la misma tendencia en la cual el complejo generó un mayor efecto inhibitorio sobre las células de fenotipo normal por sobre las de fenotipo tumoral. Estos efectos fueron observados con la misma tendencia cuando se analizaron las morfologías celulares por tinción con GIEMSA de ambas líneas celulares tratadas con los complejos. Teniendo en cuenta estos resultados sobre la viabilidad celular en los cuales el complejo el $[\text{VO}(\text{NH}_2\text{O})_2(\text{val})]$ generó menos efectos adversos sobre la línea normal sumados a la mayor estabilidad en sólido que posee este mismo complejo se decidió estudiar los efectos genotóxicos inducidos por parte del compuesto sobre ambas líneas celulares.

Los resultados mostraron que el complejo indujo daños sobre el ADN principalmente de la línea de fenotipo normal MC3T3-E1 por sobre la de fenotipo tumoral UMR106. Para esto se observó una inducción de micronúcleos y de quiebres en el ADN reflejados por los valores de *Tail Moment* mayores para la línea normal que para la tumoral en todo el rango de concentraciones testeadas. Estos resultados están en congruencia con lo observado para los ensayos de viabilidad celular y evaluación morfológica en los cuales se reportó una tendencia similar.

Por último se evaluó el efecto del complejo $[\text{VO}(\text{NH}_2\text{O})_2(\text{val})]$ sobre la inducción de ROS en ambas líneas celulares teniendo en cuenta que existen muchos reportes que relacionan a compuestos de vanadio (V) y la generación de ROS (Cuesta y col. 2011, Günther y col. 2013).

Los resultados mostraron que el complejo incrementó los valores de ROS de forma significativa en ambas líneas celulares pero generando mayores niveles de ROS sobre la línea celular normal por sobre la tumoral evidenciando un comportamiento similar al observado sobre la viabilidad celular y los efectos genotóxicos. Este resultado estaría demostrando que la generación de ROS podría estar involucrada y relacionada con la generación de efectos cito y genotóxicos en ambas líneas celulares.

Del conjunto del análisis de todos los resultados se desprende que esta serie de complejos de vanadio(V) no tiene efectos promisorios en cuanto a su propiedades antitumorales debido a que en todos los estudios realizados se vieron mayores efectos deletéreos sobre la línea osteoblástica normal por sobre la tumoral. Es por esto que carece de sentido el estudio o evaluación posterior en líneas humanas de osteosarcoma como la MG-63. Otro aspecto importante para destacar de este tipo de compuestos es su baja estabilidad en sólidos (alrededor de 2 meses) en comparación con los otros complejos trabajados en esta tesis. Este punto dificulta en gran parte los estudios biológicos ya que es muy corto el tiempo que se tiene entre la síntesis y la caracterización de los mismos, con el estudio sobre células en cultivo.

4.4 Complejos de Vanadio(IV)

4.4.1 VO(oda), VO(oda)bipy y VO(oda)phen

Uno de los aspectos importantes dentro de la química bioinorgánica es la generación quelatos estables. Para esto se utilizan ligandos que sean agentes quelantes fuertes y que nos brinden la posibilidad de atrapar diferentes especies metálicas en medios acuosos que representen sistemas biológicos (Harding y Mokdsi 2000). Una de las familias más importantes dentro de este grupo son aquellos compuestos que poseen múltiples grupos donores de oxígeno, como el oxodiacetato, $\text{O}(\text{CH}_2\text{COO}^-)_2$, (oda), el cual es un agente

complejante muy versátil, ya que presenta sus grupos donores de oxígeno en diferentes orientaciones, permitiendo la construcción de redes diversas. Por otro lado, otro grupo de ligandos interesantes son aquellos derivados de heterociclos nitrogenados los cuales poseen actividades farmacológicas propias que le permiten entre otras cosas interactuar con el ADN.

La síntesis de complejos de V(IV) con este tipo de ligandos y la evaluación de su actividad biológica, fue previamente reportado por nosotros y por otros grupos (Rivadeneira y col. 2010, Andrezálova y col. 2013).

La síntesis de los complejos VO(oda), VO(oda)bipy y VO(oda)phen fue previamente reportada por Del Rio y col. 2000, Del Rio y col. 2003, Álvarez y col. 2010). Los resultados incluidos en esta tesis mostraron una disminución de la viabilidad celular de células de osteosarcoma humano MG-63 en cultivo, en las cuales el complejo con fenantrolina evidenció la mayor actividad antitumoral por sobre sus pares en todo el rango de concentración testeado. Ensayos similares demostraron que la alteración de la actividad lisosomal y mitocondrial estarían involucrados en la citotoxicidad de estos tres compuestos de vanadio testeados. En estos se observó la misma tendencia a la hora de disminuir la viabilidad celular ($VO(oda) \leq VO(oda)bipy < VO(oda)phen$). Para contrastar estos efectos obtenidos en la línea humana de osteosarcoma se realizaron evaluaciones de la viabilidad celular sobre la línea MC3T3-E1 (osteoblastos murinos de fenotipo normal) y UMR106 (osteosarcoma de rata). Los resultados mostraron que a partir de 25 μM , pudo observarse un efecto inhibitorio dependiente de la dosis para el complejo VO(oda) en ambas líneas celulares sin observar ningún tipo de selectividad. Para el caso de VO(oda)phen, los resultados evidenciaron que este complejo es altamente deletéreo tanto para las células de fenotipo normal como tumoral desde 2.5 μM y con efecto dependiente de la concentración de 2,5 hasta 50 μM , mientras que para el caso del VO(oda)bipy solo se observaron efectos inhibitorios en ambas líneas celulares a partir de 50 μM ($p < 0,01$). De estos resultados se destaca que los osteoblastos normales son más sensibles a los complejos VO(oda) y VO(oda)phen que los tumorales en todo el rango de concentración testeado, mientras que para el caso de VO(oda)bipy se observa un efecto contrario teniendo este un efecto selectivo por las células de osteosarcoma de rata que por sobre las demás. Esta conclusión nos indica que tenemos un compuesto con baja actividad como el VO(oda), uno con actividad selectiva con respecto a células tumorales como el VO(oda)bipy y un compuesto altamente citotóxico y deletéreo, pero no específico como el VO(oda)phen.

Continuando con los estudios de las propiedades biológicas de esta serie de complejos y teniendo en cuenta la actividad intercalante de los ligandos utilizados se decidió evaluar los efectos genotóxicos ejercidos sobre las células de osteosarcoma humano MG-63. Para esto se utilizó el *test* conocido como ensayo cometa que evalúa los daños y quiebres generados sobre el ADN. Los resultados de los mismos mostraron que el complejo VO(oda)phen generó los mayores niveles de daño genotóxico en todo el rango de concentraciones testeado (2,5-10 μM) mientras que el compuesto VO(oda)bipy solo indujo valores por sobre el control a 10 μM y VO(oda) no generó efectos genotóxicos. Estos resultados coinciden con los efectos generados por la serie de complejos sobre la viabilidad celular en la cual el de mayor actividad fue el VO(oda)phen. Además, del análisis de los resultados de genotoxicidad se desprende una mayor actividad del complejo que posee el ligando fenantrolina que tiene de por sí actividades intercalantes, demostrando un mayor y evidente efecto sobre el ADN. Resultados similares de daños en el ADN pero producidos por complejos de Vanadio(V) fueron reportados por Andrezálova y col. 2013.

El siguiente paso en el estudio de los efectos biológicos causados por los complejos fue la determinación de los mecanismos de acción implicados en la acción antiproliferativa observada.

Diversos mecanismos se encuentran involucrados en los efectos citotóxicos del vanadio. Entre estos, se encuentran la generación de estrés oxidativo e inducción de apoptosis (Zhang y col., 2001, D’Cruz y Uckun, 2002). Debido a esto se determinaron los efectos producidos por la serie de complejos de vanadio sobre la generación de ROS y de apoptosis en las células de osteosarcoma humano MG-63. Los resultados obtenidos mediante la oxidación de DHR 123 en presencia de concentraciones crecientes (10-100 μM) de los complejos mostraron un aumento en la generación de ROS dependiente de la dosis para el complejo VO(oda)phen mientras que solo se registró un incremento de los ROS para la dosis más alta empleada para VO(oda) y VO(oda)bipy. Estos resultados son congruentes con lo observado hasta acá demostrando que el complejo VO(oda)phen tiene una acción deletérea mayor en la línea MG-63. Para evaluar si existe una correlación entre la generación de citotoxicidad y ROS diferencial para cada compuesto con la inducción de la apoptosis se evaluaron los efectos sobre esta utilizando la tinción anexina V/IP. Los resultados evidenciaron un incremento de la apoptosis temprana tanto para el complejo VO(oda)bipy como para VO(oda)phen siendo este último el que indujo la mayor cantidad de células apoptóticas, siguiendo el patrón de actividad observado anteriormente $\text{VO(oda)} \leq \text{VO(oda)bipy} < \text{VO(oda)phen}$.

Luego de observar los efectos de los complejos sobre la inducción de genotoxicidad y citotoxicidad y la relación de esta con la generación de ROS y apoptosis, se estudiaron los efectos de los complejos de vanadio sobre un modelo de ADN plasmídico. Los resultados evidencian una actividad nucleasa para clivar el ADN por parte de los tres complejos pero con una mayor actividad marcada para el complejo VO(oda)phen, inclusive por encima de lo generado para el control positivo. Otro aspecto para recalcar es que la actividad sobre el clivaje del ADN fue mayor en buffer fosfato que en MOPS, lo cual resulta muy relevante desde el punto de vista biológico.

Para evaluar la relación existente entre los efectos antiproliferativos de los complejos de vanadio así como de su interacción con el ADN plasmídico y la posible generación de ROS, se evaluó la actividad nucleasa sobre el clivaje del ADN para los 3 complejos en presencia de diferentes *scavengers* (NaN_3 , NaBz y DMSO) y de un inductor de ROS (H_2O_2). Los resultados indicaron que el clivaje en el ADN generado por VO(oda) como VO(oda)bipy es inhibido con la adición de los *scavengers* de ROS demostrando que la interacción del complejo con el ADN plasmídico estaría mediado por la generación de ROS debido a que cuando el ensayo se plantea con la presencia de diferentes *scavengers* el compuesto no generó la linealización del ADN. Por otro lado, cuando al ensayo se le adiciona H_2O_2 se observó un incremento en el porcentaje de la forma lineal del plásmido demostrando que uno de los intermediarios claves en tal interacción es la generación de ROS. Para el caso del VO(oda)phen los resultados fueron distintos ya que mostraron que la adición de *scavengers* no evita ni disminuye el efecto de clivaje sobre el ADN, en el cual además, se observó un efecto sinérgico entre el accionar del complejo y el H_2O_2 en el clivaje del ADN sugiriendo que la generación de ROS es uno de los mecanismos por los cuales se genera el daño en el ADN. Estos resultados muestran un alto grado de congruencia con lo observado para los ensayos de genotoxicidad, viabilidad celular, ROS y apoptosis realizadas. En este contexto es importante destacar que diversos reportes demuestran la actividad de clivaje del ADN por parte de complejos de vanadio con derivados de fenantrolina (Sam y col. 2004, Sasmal y col. 2007).

En general los complejos metálicos que se unen al ADN se estabilizan a través de una serie de interacciones como las de apilamiento “ π -stacking” que se dan con los grupos

heterociclos aromáticos de las bases nucleotídicas, o a través de puentes de H₂ e interacciones de van der Waals entre grupos funcionales dentro del surco de la hélice del ADN (Pyl y col. 1989).

4.4.2 VOsil y VOcris

La crisina y la silibinina son compuestos correspondientes al grupo de los flavonoides, los cuales son polifenoles sintetizados fundamentalmente por plantas superiores (Bors y col. 1990; Hertog y col. 1993). Los flavonoides tienen efectos antioxidantes, antiinflamatorios y anticancerígenos y además son efectivos quelantes de metales (Zhang y col. 2005), lo cual resulta interesante en las etapas de transporte y almacenamiento de diversos metales por parte de los seres vivos. La crisina posee marcadas propiedades antitumorales y antiinflamatorias y en los últimos años se la ha marcado como un potente agente antitumoral frente a cáncer de cuello de útero, colon e hígado (Sak, 2014).

Por otro lado, la silibinina tiene la capacidad de actuar contra el cáncer inhibiendo el crecimiento de células tumorales de páncreas y pulmón, entre otras (Ting y col. 2013, Mateen y col. 2013).

La generación de complejos de V(IV) con flavonoides y su posterior evaluación en sistemas biológicos ha sido reportada por otros autores con resultados alentadores. Por ejemplo, el complejo de vanadio conjugado con quercetina, bis(quercetinato)oxovanadio(IV) (BQOV) mostró actividades hipoglucemiantes y baja toxicidad en células CHO (Shukla y col. 2006). En nuestro laboratorio, se sintetizaron complejos con el catión vanadilo(IV) y diversos flavonoides como quercetina, hesperidina y morina, los cuales presentaron propiedades antitumorales y osteogénicas (Ferrer y col. 2006, Etcheverry y col. 2008, Naso y col. 2013).

Los complejos VOcris y VOsil estudiados detalladamente en este trabajo de Tesis, fueron sintetizados según lo reportado por Naso y col. 2010 y Naso y col. 2011. Ambos complejos presentaron una actividad antitumoral mayor que sus respectivos ligandos y que el metal (catión vanadilo VO⁺²) en células de osteosarcoma humano MG-63 demostrando los efectos beneficiosos de la complejación sobre la actividad biológica. Los valores de IC₅₀ obtenidos demostraron este efecto ya que el valor del mismo para el complejo VOcris fue de 16 µM en comparación con el del metal y el de la crisina que fueron mayores a 100 µM. Lo mismo ocurre para el complejo VOsil para el cual se obtuvo un valor de IC₅₀ de 74 µM por sobre lo obtenido para el ligando silibinina (89 µM). Efectos similares fueron reportados por Kuntic y col. donde se evidenciaron los efectos beneficiosos de la complejación de flavonoides como la hesperidina y la rutina con metales como el Cu(II) en la actividad anticoagulante de los mismos (Kuntic y col. 2011). Además ambos complejos, pero en mayor extensión el VOcris, mostraron una acción antitumoral mayor en la línea tumoral MG-63 que el quimioterapéutico comercial de platino denominado *cis*-diaminodicloroplatino(II) (*cis*-Pt), demostrando de esta manera su potencial aplicación debido a que el *cis*-Pt es ampliamente utilizado para el tratamiento de diversos tipos de tumores entre ellos el osteosarcoma. Observando los valores obtenidos para los IC₅₀ de estos compuestos en la línea MG-63, se ve claramente reflejada esa diferencia de acción (IC₅₀VOcris = 16 µM IC₅₀ *cis*-Pt = 39 µM). Con el fin de conocer los efectos citotóxicos de este tipo de compuestos de vanadio sobre células de fenotipo normal, se procedió a evaluar los mismos sobre células mononucleares derivadas de sangre periférica. Los resultados obtenidos demostraron un efecto citotóxico muy bajo sobre este tipo celular normal y solamente comprobado para el complejo VOsil a 100 µM, lo cual es un resultado muy alentador ya que la principal vía de administración de este

tipo de drogas de potencial uso para el tratamiento del cáncer es intravenosa, por lo cual el fármaco toma inmediato contacto con las células de la sangre para ser transportado a los demás órganos sin generar grandes daños en dichas células. Este aspecto es muy importante en el diseño y la generación racional de nuevas drogas quimioterapéuticas, donde se trata de encontrar el menor daño generado a las células normales y el mayor efecto deletéreo sobre células tumorales, que es lo que ocurre para el caso de ambos complejos de vanadio. En concordancia con esta situación, los resultados obtenidos en las líneas tumorales de osteosarcoma humano (MG-63) y de rata (UMR106) fueron comparados con resultados previamente reportados por nuestro laboratorio sobre los efectos de ambos complejos en la línea osteoblástica de fenotipo normal MC3T3-E1. Los mismos demostraron la acción selectiva de ambos compuestos sobre las líneas tumorales, pero principalmente del complejo VOcris que tuvo acciones deletéreas mayores en ambas líneas tumorales por sobre la de fenotipo normal en todo el rango de concentraciones probadas (25-100 μM). Estos resultados resultan de vital importancia ya que se cumple con una condición muy importante a la hora de considerar fármacos aplicables a quimioterapia y es que éstos generen el mayor efecto antitumoral con el menor efecto adverso para el paciente. Si bien la mayoría de las concentraciones empleadas en este tipo de estudios (2,5-100 μM) son relativamente más altas que las concentraciones séricas que se alcanzan cuando se tratan ratas con 50 mg/ día de sulfato de vanadilo (10-15 μM) (Shechter y col. 1995; Thompson y col. 1998), como el vanadio se acumula principalmente en huesos, puede alcanzar allí concentraciones relativamente más altas (26,4 $\mu\text{g/g}$ de peso seco) (Yuen y col. 1993). Es por esto que las dosis empleadas en nuestros estudios son consistentes con las concentraciones alcanzadas *in vivo* en el microambiente óseo. El siguiente paso en el estudio de las propiedades biológicas de ambos complejos de vanadio con flavonoides fue evaluar sus efectos genotóxicos sobre las células de osteosarcoma humano MG-63. Para esto se utilizaron dos *tests* ampliamente empleados en este tipo de evaluaciones como son el ensayo cometa y el de micronúcleos. Los resultados de los mismos mostraron que ambos complejos poseen acciones genotóxicas pero utilizando mecanismos distintos debido a que observamos que la tasa de inducción de micronúcleos es mucho mayor para el complejo VOsil que para VOcris, pero la inducción de quiebres en la molécula de ADN evaluada por el método cometa es superior para el complejo VOcris en todas las concentraciones probadas (2,5-10 μM). Para este último ensayo VOsil sólo indujo quiebres en el ADN a la concentración más alta probada en este tipo de ensayos (10 μM), demostrando que ambos complejos inducen efectos genotóxicos pero VOcris principalmente lo hace induciendo quiebres en la molécula del ADN mientras que VOsil incrementando la frecuencia de aberraciones genéticas como es la generación de micronúcleos.

El próximo paso en el estudio de los efectos biológicos causados por ambos complejos fue la determinación de los mecanismos de acción implicados en la acción antitumoral observada.

Existen diferentes mecanismos para explicar los efectos citotóxicos del vanadio. Entre ellos, se encuentran la generación de estrés oxidativo e inducción de apoptosis (Zhang y col., 2001, D’Cruz y Uckun, 2002). Se ha propuesto que el vanadio puede inducir la formación de ROS en sistemas biológicos utilizando diversos mecanismos que pueden involucrar reacciones tipo Fenton, bioreducción del vanadato mediado por GSH o NADPH oxidasas o la promoción indirecta de la producción de ROS, probablemente mediante interacción con las mitocondrias (Gándara y col. 2005). Además, el vanadilo(IV) en presencia de H_2O_2 genera radicales hidroxilos en la hidrólisis de ácidos grasos catalizada por el metal y también radicales hidroperóxidos, los cuales a su vez inician la formación de dienos conjugados durante la lipoperoxidación (Keller y col.

1988, Trudel y col. 1991). Existen diferentes sondas fluorescentes para determinar los niveles de ROS intracelulares, entre ellas se encuentra la sonda DHR123 que se asocia a las mitocondrias y detecta diferentes ROS, pero principalmente H_2O_2 (Capella 2007; Qin y col. 2008). Los resultados obtenidos mediante la oxidación de DHR 123 en presencia de concentraciones crecientes (10-100 μM) de ambos complejos mostraron un incremento en la generación de ROS que fue dependiente de la dosis del complejo y en concordancia con lo observado para los resultados de viabilidad celular, una mayor generación de ROS inducida por VOcris. La generación de ROS producida por ambos complejos fue inhibida parcialmente en las células con el agregado de un *scavenger* (mezcla de vitaminas C y E), las cuales se observó una recuperación parcial de la viabilidad celular cuando usamos concentraciones medias de complejo (25 y 50 μM) y no se observó recuperación alguna para concentraciones altas (75 y 100 μM), probablemente debido a los altos niveles de ROS producidos. Es conocido que una generación sostenida de ROS usualmente produce un desbalance en el estado redox intracelular. En este proceso, el glutatión juega un papel fundamental. Generalmente, la capacidad antioxidante de los compuestos tiol se debe al átomo de azufre que puede fácilmente acomodar la pérdida de un electrón (Karoui y col. 1996). Los radicales tiol que se generan pueden luego dimerizarse para formar GSSG. Este glutatión oxidado puede acumularse en el interior celular por lo que la proporción GSH/GSSG es un buen indicador del estrés oxidativo (Hwang y col. 1992; Giovagnini y col. 2008). Es por esto que se midió la relación entre GSH/GSSG luego de los tratamientos con ambos complejos. Los resultados mostraron una depleción en la cupla GSH/GSSG cuando las células son tratadas con los complejos, generándose una disminución de la misma a partir del tratamiento con 10 μM de VOcris y 25 μM de VOsil observándose un efecto similar a lo obtenido para el ensayo de estrés oxidativo. El glutatión posee varias funciones contra el estrés oxidativo como son: es un cofactor de diferentes enzimas detoxificantes como la glutatión peroxidasa (GPx) entre otras, el GSH secuestra directamente radicales hidroxilos y oxígeno singlete, detoxificando peróxido de hidrógeno y lipoperóxidos por la acción catalítica de la glutatión peroxidasa y regenera antioxidantes como la vitamina C a su forma activa. Debido a esto es que se procedió a estudiar los efectos deletéreos de ambos complejos en presencia de un *plus* citoprotector de GSH. Los resultados encontrados mostraron un incremento en la viabilidad celular para los tratamientos realizados con VOcris y VOsil inhibiendo parcialmente el efecto antiproliferativo por parte de los mismos mostrando un rol preponderante de las defensas propias de las células contra las injurias del estrés oxidativo. Resultados similares fueron reportados por Capella y col. 2007, en los cuales el GSH, además de su acción antioxidante, puede regular el estado redox intracelular ayudando a mantener los grupos sulfhidrilos de las proteínas en su forma reducida y prevenir así la oxidación en residuos de cisteínas que ocurre bajo estrés oxidativo (Lu y Cederbaum 2008).

Otro mecanismo aparentemente implicado en la acción antitumoral de diversos compuestos basados en metales son los efectos que los metalofármacos producen sobre las distintas etapas del ciclo celular. Se sabe que en muchos tipos de cánceres se generan desregulaciones en el ciclo celular y como consecuencia de esa falta de control se generan exacerbaciones en la proliferación de esas células. Es por esto que muchas drogas citotóxicas utilizadas en quimioterapia ejercen su efecto dañando el potencial reproductivo de las células tumorales (dañando el ADN o su síntesis) utilizando diversos mecanismos como inhibición de la replicación, roturas simples y dobles en las cadenas del ADN que conllevan al arresto del ciclo celular. Dentro de este tipo de drogas tenemos agentes que son específicos ya que actúan en fases del ciclo celular (que dependen de la producción de un único tipo de bloqueo bioquímico en una reacción dentro de una fase

particular del ciclo celular), así como agentes no específicos (el efecto citotóxico es independiente de la fase del ciclo). El ioduro de propidio es un agente intercalante del ADN que tiene la propiedad de intercalarse entre los pares de bases del ADN y emitir fluorescencia a una longitud de onda característica (617 nm). Es por esto que este colorante es ampliamente utilizado para teñir las células y realizar estudios sobre el ADN de las mismas para conocer como se altera la distribución de las fases del ciclo celular. Los resultados obtenidos en este aspecto demostraron la presencia de un arresto en fase G₂/M para ambos complejos de vanadio. El caso más evidente se observó para el VOsil con el cual se produjo un arresto celular en fase G₂/M cuando tratamos a las células con 100 μM por 6 h y luego a 25 μM por 24 h demostrando el efecto del progreso del tiempo y la concentración de la droga en la acción sobre el ciclo celular. En este análisis también observamos que al tiempo más largo de incubación (24 h) las células posteriormente al arresto celular fueron enviadas a apoptosis evidenciada por la aparición del pico sub G₁ que indica la presencia de fragmentación en el ADN característica de eventos apoptóticos. Para el VOcris se observó un arresto en fase G₂/M solo luego de incubar 6 h con 25 μM del complejo ya que posteriormente a ese tiempo, debido a la alta citotoxicidad generada por el complejo, las células fueron enviadas a apoptosis. Resultados similares son reportados para el caso del vanadato, el cual induce arresto del ciclo celular en la fase G₂/M de fibroblastos deficientes en p53 o para el ortovanadato que genera arresto celular en fase G₂/M en conjunto con apoptosis en células tumorales de hígado (Zhang y col. 2002, Wu y col. 2014).

Para el caso de vanadio(IV) se ha reportado el efecto sobre el arresto del ciclo celular y su relación con la muerte celular programada para un complejo de oxovanadio(IV) con el ligando salen (salicilaldehído y etilendiamino) que evidencia el arresto en fase G₂/M por si solo, así como un aumento de la apoptosis en presencia del quimioterapéutico comercial taxol (Meshkini y Yazdanparast, 2010).

La apoptosis es considerada un mecanismo de muerte celular, la cual se origina a través de la acción de diferentes agentes endógenos o exógenos (Silvestri y col. 1995). La ejecución de la misma está asociada a una serie de características morfológicas y cambios bioquímicos los cuales están directamente relacionados con la activación de una cascada de proteasas denominadas caspasas así como de nucleasas que degradan el ADN en fragmentos de tamaño nucleosomal (180 pares de bases y múltiples) aunque este requisito no es imprescindible. Paralelamente, se observan cambios morfológicos tales como la condensación nuclear y citoplásmica y la aparición de cuerpos apoptóticos de manera que la célula en proceso de muerte se fragmenta y es rápidamente fagocitada por macrófagos o células adyacentes. Uno de los principales adelantos ocurridos en la última década, en el campo de la investigación sobre el cáncer, lo constituyó el estudio de la apoptosis. En este sentido existe un consenso en plantear que junto a la desregulación del crecimiento, la inhibición de la apoptosis desempeña un rol esencial en el proceso tumoral. Diversos estudios cinéticos del crecimiento tumoral han revelado una alta frecuencia de apoptosis tanto en tumores que regresan de manera espontánea, como en tumores tratados con tratamientos radiactivos y drogas quimioterapéuticas (Wyllie y col. 1980). Independientemente del tipo celular y de la naturaleza del agente “disparador”, uno de los eventos apoptóticos tempranos característicos es la externalización del fosfolípido de membrana plasmática, fosfatidilserina (PS). La anexina V-FITC es una sonda fluorescente con alta afinidad por la PS que permite mediante su unión, la determinación de apoptosis temprana. Los resultados obtenidos en nuestros estudios empleando citometría de flujo, mostraron un incremento en el porcentaje de células apoptóticas tempranas luego de 6 h de incubación con el complejo VOcris. Luego de 24 h de incubación con el complejo esa fracción temprana pasó a formar parte de la fracción de

apoptosis tardía doblemente marcada Anexina V (+)/ IP (+), obteniéndose valores de 49 y 74 % para 25 y 100 μM de VOcris. Para el caso del complejo VOsil se observó un incremento de la fracción de apoptosis temprana (Anexina V (+)/ IP (-)) para 25 μM y de apoptosis temprana y tardía para 100 μM luego de 6 h de incubación con el mismo. Para 24 h de incubación gran parte de la fracción de células apoptóticas tempranas inducidas anteriormente pasaron a formar parte de la población de células apoptóticas tardías obteniéndose valores de 30% y 60% para los tratamientos con 25 y 100 μM , respectivamente. En concordancia con estas medidas de apoptosis se determinó la inducción de la activación de la caspasa-3 como un método de confirmación de la presencia de la apoptosis como mecanismo de acción involucrado en los efectos deletéreos de ambos metalofármacos. Los resultados indicaron que ambos complejos activaron a la caspasa-3 de forma dependiente de la concentración demostrando la activación de la misma la cual actúa como una caspasa efectora en el proceso de apoptosis celular. En concordancia con nuestros resultados otros autores también han reportado que diversas sales inorgánicas de vanadio(IV) y vanadio(V) como VOSO_4 o NaVO_3 , y pentóxido de vanadio inducen apoptosis en diferentes tipos celulares (Goncalves y col. 2011, Montiel-Davalos y col. 2012, Zhao y col. 2010).

Además para el caso del pentóxido de vanadio se ha demostrado que éste indujo apoptosis en células neuronales de rata incrementando los niveles de caspasa-3, Bcl-2 y Bax (Zhao y col. 2013).

Para el caso de los complejos de vanadio, nuestro grupo ha reportado la inducción de apoptosis con activación de caspasa-3 para diversos complejos de vanadio(IV) y (V) en líneas tumorales de hueso y mama (Rivadeneira y col. 2009, Rivadeneira y col. 2010, Naso y col. 2013).

En muchos casos la apoptosis está asociada a la generación de ROS, como fue reportado para un amplio rango de tipos celulares. Con respecto a eso se ha demostrado que la inducción del estrés oxidativo por el vanadio conduce a la muerte en diferentes tipos celulares por procesos apoptóticos y/o necróticos (Molinuevo y col. 2004; Chien y col. 2006; Caicedo 2008, Rivadeneira y col. 2009, Rivadeneira y col. 2010).

La ocurrencia secuencial de los cambios morfológicos y la apoptosis puede reflejar una interacción entre la reorganización de la actina del citoesqueleto y la maquinaria de la apoptosis. La alteración de la actina del citoesqueleto daña a la membrana mitocondrial, lo que a su vez causa la liberación de citocromo c y la activación de caspasas con el clivaje de proteínas *down stream* incluyendo la actina del citoesqueleto (Yamazaki y col. 2000). En células intactas, los filamentos de actina unen y secuestran DNasa I, una endonucleasa que cliva el ADN genómico. La alteración de la actina del citoesqueleto libera a la DNasa I causando fragmentación nuclear (Yuan y col. 2007). El arreglo de los filamentos de actina también se alteró en presencia de 25 μM de ambos complejos, observándose una disgregación y desorganización del mismo, lo que nos lleva a pensar en una posible relación entre este efecto y la apoptosis anteriormente reportada para este tipo de compuestos. Además en el mismo esquema de estudio de morfología celular observamos que el núcleo celular, utilizando yoduro de propidio, sufre diversas modificaciones así como fragmentación del ADN debido a la acción deletérea de los complejos.

Otro aspecto muy importante a la hora del estudio de los mecanismos de acción de diversos quimioterapéuticos es el efecto y la interacción que éstos ejercen sobre la expresión de proteínas involucradas con el cáncer. Una familia de proteínas muy importantes que han tomado particular relevancia en los últimos años debido a sus múltiples funciones en diversos procesos biológicos como el cáncer son las galectinas (1381 citas en PubMed galectinas y cáncer). Éstas constituyen una familia de β -galactosil

binding proteínas extremadamente conservadas a través de la evolución que han sido involucradas en un amplio espectro de eventos biológicos (Vasta 2012)

Además, se ha observado que estas proteínas ejercen sus efectos biológicos a través del reconocimiento de azúcares específicos en ligandos intracelulares, receptores de membrana y glicoproteínas extracelulares, y que la expresión de las mismas se modifica drásticamente en respuesta a diferentes agentes como productos de genes oncosupresores, oncogenes y diversos agentes inflamatorios e infecciosos (Rabinovich y col. 1998).

Es por esto que se decidió estudiar la relación existente entre los cambios en la expresión de las galectinas 1 y 3 con los efectos antitumorales de los complejos VOcris y VOsil en células de osteosarcoma humano MG-63. A pesar de la implicancia biológica de las galectinas, existen escasos reportes que indican la relación entre metales y la modificación de la expresión de galectinas. Uno de ellos reporta que se observó que para ratas expuestas a Cr(VI) los niveles de expresión de Gal 1 en el estómago y el colon, los cuales fueron incrementados en presencia del metal (Tsao y col. 2011).

A contrapunto de esto, Chang y col reportaron los efectos generados por el arsénico sobre la expresión de Gal 1 en fibroblastos 3T3 y células de cáncer oral KB. En éste se observó que concentraciones crecientes de arsénico generaron una disminución en la expresión de la Gal 1 en ambas líneas celulares (Chang y col. 2011).

Para el caso de Gal 3, un trabajo realizado sobre ratas Wistar mostró que se incrementaron los niveles de Gal 3 en tejido cardiaco de animales que fueron tratados con cadmio en respuesta a la inflamación y la apoptosis generada (Yazihan y col. 2011).

Por otro lado, un reporte reciente indicó que la expresión *de novo* de Gal 3 en células de melanoma redujo las defensas antioxidantes celulares e incrementó la susceptibilidad de las mismas a la acción citotóxica de metalodrogas de cobre, demostrando el rol preponderante que tiene la sobreexpresión de Gal 3 intracelular. (Borges y col. 2013)

Los análisis realizados en esta tesis sobre la variación en la expresión del mensajero de Gal 1 y Gal 3 demostraron que ambos complejos disminuyeron la expresión del mensajero para ambas concentraciones probadas de fármaco (25 y 100 μ M) y luego de 1, 3 y 6 h de incubación. De esta forma se logró estudiar los efectos de ambos complejos de vanadio sobre la secreción de ambas galectinas al medio extracelular. En congruencia con lo observado para los resultados de la expresión del mensajero, se observó que luego de 3 h de incubación con el complejo VOcris se disminuyeron los niveles de Gal 1 secretada al medio extracelular, obteniéndose valores de 42 ngr/mL de Gal 1 en comparación con los 34 y 26 ng/mL encontrados luego del tratamiento con 25 y 100 μ M de VOcris. Luego de 6 h de incubación ese efecto desapareció y posteriormente a 16 h ese efecto fue invertido ya que tanto para tratamientos con 10 y 25 μ M de VOcris los niveles de Gal 1 en el sobrenadante se incrementan por sobre el control llegándose a valores por encima de los 50 ngr/mL debido probablemente a la acción citotóxica que tiene el complejo en esos tiempos de incubación que hace que parte de la Gal 1 intracelular se libere al medio extracelular. En concordancia con estos resultados se observó la misma tendencia para la secreción de Gal 1 cuando fue referida a la cantidad de proteínas totales presentes en el sobrenadante, en las cuales observamos una disminución de los niveles de Gal 1 luego de 3 h de incubación para VOcris pero un incremento de ese valor luego de las 6 h de incubación, tiempo al cual comenzaron a hacerse notables los efectos citotóxicos del complejo. Este efecto no se observó para el VOsil para el cual tanto a 3 como a 6 h se encontró una disminución de los niveles de Gal 1 en el sobrenadante debido a que este compuesto comienza a ser citotóxico a tiempos más largos. En concordancia con lo observado en los ensayos de expresión, los niveles secretados de Gal 3 en el sobrenadante

fueron menores a 10 ngr/mL demostrando que en la línea celular MG-63 los niveles de expresión de Gal 3 son menores que los de Gal 1.

Podemos observar que el nivel de galectina secretada al espacio extracelular puede no variar demasiado debido a q la galectina secretada podría volverse a unir a la célula para cumplir su función manteniendo un nivel constante que generaría un efecto regulatorio desde el punto de vista biológico dentro de la célula. En relación a esa posible homeostasis que es interrumpida por la acción de los metalofármacos es esperable q la concentración de Gal 1 secretada por la célula se encuentre en el orden de 20 a 100 ng/mL como lo reportan otros autores para otras líneas celulares como HUVEC o KS (Croci y col. 2012). Recientemente se han publicado resultados que indican que una disminución en la expresión de Gal 1 en la línea de osteosarcoma humano MG-63 suprime el crecimiento, la invasión y la capacidad tumorigénica de la misma, demostrando la importancia de esta proteína en el desarrollo y la agresividad tumoral de la línea celular de hueso. Los autores realizaron un *knockdown* para Gal 1 que suprimió la actividad proliferante y el potencial invasivo generando además apoptosis en las células MG-63 con una disminución en la expresión de las señales p38MAPK, p-ERK, Ki-67 (Miao y col. 2014).

Para el caso de los tratamientos realizados en esta tesis con los metalofármacos de vanadio observamos una disminución en la expresión de Gal 1 que, acorde a lo reportado por Miao y col., disminuye la agresividad y el potencial metastásico de la línea celular MG-63. Estos efectos podrían estar relacionados estrechamente con los efectos antitumorales generados por los complejos de vanadio y podrían plantearse como uno de los posibles mecanismos de acción de los mismos. Además, los mismos autores demuestran que la Gal 1 podría representar un potencial blanco para el tratamiento de los osteosarcomas.

Otro resultado importante de destacar es el papel que tienen los efectos de ambos complejos en la modulación de la expresión de las neuraminidasas 1 y 3, los cuales fueron también investigados. Estas enzimas poseen la función de clivar residuos de ácido siálico en la membrana deglicosilando la misma y dejando expuestos otros residuos glucosídicos importantes. Específicamente esta enzima cataliza la ruptura de las uniones α -(2,6) o α -(2,3) cetosídicas, existentes en el ácido siálico terminal (N-acetil-neuramínico) con residuo de galactosa adyacente, dejando de esta manera residuos de galactosa expuestos en la superficie. Los cambios en la expresión de las Neu 1 y 3 por exposición a VOcris y VOsil en las células de osteosarcoma humano mostraron una tendencia de aumento en la expresión de ambas neuraminidasas luego de 3 h de incubación. El mismo efecto fue observado luego de 6 h para la Neu 1 en la cual la sobreexpresión generada por ambos compuestos de vanadio llegó a ser aproximadamente el triple que la observada para el basal. Estos efectos de sobreexpresión de los mensajeros de las neuraminidasas si se correlacionaran con un aumento en la expresión de la proteína y así en su actividad enzimática podrían eventualmente ejercer una actividad mayor dejando expuestos más residuos de azúcares en superficie como las galactosas que son moléculas blanco de muchos otros efectores contra el cáncer como puede ser el caso de las galectinas. Es por esto que se decidió estudiar el efecto de ambos complejos sobre la inducción de azúcares en superficie. Para eso se trabajó con lectinas comerciales que reconocen distintos tipos de glúcidos en la membrana celular realizando las mediciones por métodos colorimétricos y fluororimétricos. Los resultados indicaron un incremento en la unión por parte de las lectinas PNA y MAA a azúcares de superficie para el tratamiento con 100 μ M de VOcris durante 3 h. En este caso ese incremento demostró una inducción de la exposición de azúcares en superficie específicamente de galactosa (azúcar reconocido por PNA) y de ácido siálico (reconocido por MAA). Existen diversas posibilidades por las cuales el vanadio y sus complejos podrían eventualmente incrementar la generación y exposición de azúcares tales como galactosa o ácido siálico en la superficie celular. Una

de ellas es que dentro de los efectos farmacológicos destacados para el vanadio se encuentra la capacidad insulino-mimética del mismo la cual le permite captar glucosa del medio para introducirla a la célula y así tener mayores niveles intracelulares de azúcares para realizar la síntesis de otros derivados. En esa dirección existen reportes que indican que el vanadio y sus complejos ejercen un efecto inhibitorio sobre las α -glucosidasas y que contribuyen a un efecto similar al descrito anteriormente (Misra y col. 2011).

Otro reporte indica que el vanadio incrementa los niveles de sialiltransferasas particularmente la N-acetil-galactosamina-transferasa 2 en células de leucemia HL-60 lo cual genera una exposición de galactosa en superficie y una mayor unión por parte de PNA en esa misma línea celular tumoral. (Gao y col. 2011).

Considerando los resultados obtenidos para la inducción de residuos de galactosa y de ácido siálico en superficie en el tratamiento realizado con VOcris, se decidió estudiar los efectos combinados de una exposición con VOcris que incrementa esos azúcares en superficie más la conocida acción proapoptótica de las galectinas 1 y 3 exógenas, previamente reportadas en otros tipos celulares (Perillo y col. 1995, Matarrese y col. 2005, Rabinovich y Illarregui, 2009, Muglia y col. 2011, Fortuna-Costa y col. 2014).

Como primera medida se decidió investigar los efectos proapoptóticos de las Gal 1 y Gal 3 en la línea de osteosarcoma humano MG-63. Para esto se realizaron incubaciones de 6 y 24 h con 150 $\mu\text{g/mL}$ de ambas galectinas, observándose el efecto proapoptótico que éstas poseen sobre la línea de osteosarcoma humano MG-63. Para complementar estos estudios y conocer si parte de los efectos apoptóticos para ambas galectinas estaban vinculados con una interacción proteína-carbohidrato, se realizaron estudios de los mismos efectos pero con preincubación en un medio de lactosa 100 mM y sacarosa 100 mM. En éstos se observó la importancia de la interacción proteína-carbohidrato en los efectos sobre la muerte celular. En efecto, las galectinas pretratadas con lactosa (100 mM) tuvieron un efecto inhibitorio por la interacción con el azúcar que disminuyó drásticamente sus efectos pro-apoptóticos tanto para la Gal 1 como para la Gal 3.

Una vez demostrado los efectos deletéreos de las galectinas sobre la muerte celular en la línea MG-63 se decidió probar la terapia combinada entre VOcris (incubaciones a tiempos cortos) y Gal 1 y 3. Los resultados mostraron un incremento en la muerte celular programada (apoptosis) evaluada por la tinción de anexina V/IP para el tratamiento realizado con 3 h de incubación previa para VOcris y el posterior agregado de 75 y 100 $\mu\text{g/mL}$ de Gal 3 por sobre lo observado para el control en el cual no se le realizó el pretratamiento con el complejo de vanadio. Resultados similares fueron encontrados para un tratamiento equivalente con vanadio pero esta vez utilizando el agregado de 25 y 50 $\mu\text{g/mL}$ de Gal 1 exógena, debido a que concentraciones más altas de Gal 1 generaron un nivel de muerte celular tan alto que no nos permite comparar entre el tratamiento control y el tratamiento con el metalofármaco generado por la Gal 1. Estos resultados son el primer reporte sobre una terapia combinada utilizando un metalofármaco y la acción apoptótica de las galectinas exógenas. Los resultados obtenidos indican que esta es una terapia efectiva para el tratamiento del osteosarcoma en cultivo y que potencialmente puede ser aplicada para el tratamiento de otro tipo de tumores.

Con el fin de continuar los estudios de los efectos de los complejos de vanadio sobre la línea celular de osteosarcoma humano MG-63 se llevaron a cabo experimentos de encapsulamiento y liberación controlada del complejo VOcris en matrices poliméricas a base de poliuretano. La idea principal es tratar de comprender los cambios y los posibles efectos en la acción farmacológica del complejo generados por la liberación controlada de este en comparación con la exposición directa. Este complejo fue seleccionado para esto debido a que posee un peso molecular y un tamaño acorde para ser encapsulado en este tipo de matrices y por su potencial capacidad como agente antitumoral demostrada

previamente por exposición directa en cultivos celulares de osteoblastos tumorales (en comparación con el VOsil que posee menores efectos antitumorales y un tamaño más grande, lo que dificulta su encapsulamiento).

Para la correcta elección de la matriz polimérica se realizaron estudios previos de biocompatibilidad (ensayo de viabilidad celular) de 3 matrices a base de poliuretano, sintetizados empleando dos diisocianatos, di(4-isocianatociclohexil)metano (H12MDI) e diisocianato de isoforona (IPDI) y de una matriz compuesta con un metacrilato de amina terciaria con células en cultivo. Los resultados indicaron que la única matriz que no fue citotóxica para la línea MG-63 fue la derivada de PUH12. Estos resultados nos llevaron a seleccionar a la matriz PUH12 como el modelo a utilizar en la liberación de nuestra droga. Luego se decidió encapsular la droga en esa matriz partiendo de dos cantidades iniciales distintas (16 y 23 mg), llegándose a valores de alrededor de 50 μM y de 250 μM para la primera y la segunda carga luego de 24 h de liberación. Si comparamos esos valores de liberación con las concentraciones que probadas por exposición directa (2,5-100 μM), se observa claramente que el modelo que mejor se ajusta es el que parte de una carga menor de complejo (16 mg), es por esto que se experimentó con este modelo de matriz cargada con complejo y se evaluó su actividad biológica sobre células MG-63 en cultivo. Los resultados de viabilidad celular sobre la línea MG-63 demostraron un efecto antitumoral mayor para la matriz cargada con VOcris luego de 24 h de liberación controlada, por sobre lo ocurrido por exposición directa, lo cual demuestra el posible uso y aplicación de este tipo de materiales en el área de la biomedicina con el fin de mejorar las propiedades biológicas y generar una dosis justa que evite los posibles efectos secundarios. Existen diferentes reportes acerca de las distintas alternativas de liberación de fármacos con respecto al vanadio. La mayoría de ellas busca mejorar o potenciar los efectos farmacológicos del vanadio como antioxidante o insulinoimético (Karmaker y col. 2006, Soumya y col. 2014).

Antes de que un posible principio activo pueda ser probado en seres humanos, es necesario realizar ensayos preclínicos. Aquí se prueba la toxicidad de la sustancia o su posible daño al cuerpo humano. Estas pruebas a veces se llevan a cabo en cultivos celulares (*in vitro*), y otras, sin embargo, es indispensable que las pruebas se realicen en el organismo (*in vivo*). Los modelos animales incrementan en gran medida la capacidad de los científicos de estudiar la eficacia y la seguridad de los candidatos a medicamentos nuevos. Los compuestos que potencialmente den origen a fármacos se analizan en estos modelos animales lo que permite que los investigadores comprueben la aparición de efectos adversos secundarios antes de administrarlos a seres humanos. En este sentido, uno de los temas de gran importancia dentro de la ciencia de los animales de laboratorio es el desarrollo de modelos animales capaces de reproducir enfermedades humanas que sirvan para realizar investigaciones correspondientes a la característica de la enfermedad y su tratamiento. Para el caso del cáncer, desde fines del siglo XIX se utilizan ratones para la investigación del mismo, especialmente para estudiar los procesos de crecimiento tumoral, metástasis y nuevas terapias. En el año 1962, se obtuvo un *stock* de ratones inmunodeficientes N:NIH(S)-*nu* (*nude*) que se transformó en una importante herramienta para los estudios oncológicos, ya que los mismos permitieron la inoculación de tumores procedentes de otras especies, inclusive de origen humano, lo que abrió el estudio *in vivo* de los mismos. (Dooley y col 1993).

Estos animales surgieron por una mutación espontánea y recesiva asociada a la ausencia de pelo y aplasia del timo, característica que produce numerosos defectos del sistema inmunológico debido a deficiencias funcionales y cuantitativas de los linfocitos T, por la cual los individuos homocigotas recesivos no rechazan tejidos alogénicos ni xenogénicos (MacDonald y col. 1986).

El descubrimiento de que los tumores humanos podían crecer en ratones *nude* produjo una gran revolución dentro del campo de la ciencia, siendo éste ampliamente utilizado en la investigación de los factores reguladores del crecimiento de los tumores transplantados y de las metástasis.

Reportes bibliográficos recientes indican que la línea celular de osteosarcoma humano MG-63 no se establece en ratones *nude*, inclusive utilizando una metodología experimental en la cual se emplean tres posiciones de inoculación simultánea (dos subcutáneas y una intramuscular) con 2×10^6 células/animal en un solo animal ($n=1$) y una repetición del procedimiento en otro animal ($n=1$). (Mohseny y col 2011). Es por esto que los mismos autores recomiendan la línea MG-63 para estudiar efectos de drogas quimioterapéuticas en modelos en cultivo 3D como la realización de esferoides, pero no para la utilización en ensayos *in vivo* ni para el estudio de la tumorigénesis y la respuesta a drogas (Mohseny y col. 2012).

Con esos resultados previos se decidió realizar la generación y establecimiento de la línea tumoral de osteosarcoma humano MG-63 en animales *nude* de la cepa **N:NIH(S) Fox1tm**. Los resultados mostraron que el establecimiento de la línea celular en el modelo murino fue exitoso tanto para machos como para hembras, en las cuales se logró establecer y repicar la línea celular. Para esto se probaron varias cantidades iniciales de células como inóculo llegando a la conclusión de que con 2×10^6 células/animal se obtuvieron los tumores con volúmenes deseados en el menor tiempo de crecimiento. Estos evidenciaron que el crecimiento del tumor se produjo en un lapso de tiempo menor y con mayores volúmenes tumorales para las hembras que para los machos, tal vez poniendo en evidencia la relación con alguna cuestión hormonal presente sólo en las hembras. Todos estos resultados fueron acompañados por la histopatología realizada sobre cortes del tumor producido tanto para machos como para hembras donde se resaltan todas las características morfológicas y de ontogenia pertenecientes al osteosarcoma, confirmando el establecimiento y la generación correspondiente del modelo murino xenotransplantado con la línea celular humana MG-63. Es importante destacar que en ninguno de los animales xenotransplantados con el tumor se observó la presencia de metástasis en otros órganos, como puede ser el pulmón lo que fue reportado para otras líneas osteoblásticas tumorales en modelos animales (Mohseny y col. 2011).

Actualmente se ha reportado la generación de un modelo animal en ratones *nude* con la línea MG-63 para el estudio de los efectos antitumorales de antagonistas del receptor de neurokinina-1. En este sistema solo se utilizaron hembras y el inóculo inicial de células fue de 2×10^7 células/animal, el cual es considerablemente más alto que el probado por nosotros (2×10^6 células/animal). Este último aspecto es un dato muy importante a tener en cuenta en la optimización y la generación de este modelo ya que en el modelo surgido de esta tesis la concentración inicial de células es 10 veces menor que la utilizada en el trabajo reportado por Muñoz y col. 2014.

Estos aspectos deben ser considerados a la hora de generar un modelo xenotrasplantado con una línea tumoral humana considerando la ética y el bienestar animal por sobre todas las cosas.

Una vez generado el modelo animal se procedió a estudiar las propiedades antitumorales del complejo VOcris sobre el osteosarcoma generado en el ratón *nude*. Los resultados demostraron una reducción del volumen tumoral a lo largo de los días de tratamiento en comparación con el control para ambas dosis (1000 μM = 5 mg VOcris/kg animal y 5000 μM = 25 mg VOcris/kg animal), pero demostrándose un efecto farmacológico mayor para la dosis más alta. Se observó que la reducción del volumen tumoral alrededor del sexto día de tratamiento fue máxima para ambas concentraciones. Otro aspecto muy importante a tener en cuenta en este tipo de ensayos fue que ninguno de los tratamientos realizados

con el complejo afectó el bienestar general de los animales, generando efectos adversos en los mismos. Los niveles de toxicidad del complejo en los animales fueron evaluados a través de la inspección diaria de los mismos y del peso del animal, en los cuales no se observó ningún tipo de modificación. Existen diversos reportes bibliográficos que muestran diferentes efectos biológicos de sales y complejos de vanadio en sistemas *in vivo* (Bishayee y col. 2010).

En éstos podemos observar una variabilidad muy grande en cuanto al tipo de tumor a tratar, las concentraciones probadas, días de tratamiento, efectividad, así como de los efectos secundarios obtenidos. Para el caso de tumores de mama, uno de los primeros artículos indica que el tratamiento con 25 mg/L de sulfato de vanadilo durante 180 días, disminuye la incidencia, el número y la multiplicidad de tumores mamarios inducidos por 1-metil-1-nitrosourea en ratas Sprague–Dawley.(Thompson y col. 1984).

Además, uno de los complejos con mayor efecto *in vivo* fue el bis(4,7-dimetil-1,10-fenantrolina sulfato oxovanadio(IV) conocido comúnmente como METVAN, el cual disminuyó el tamaño del tumor y la progresión del mismo en ratones hembras CB.17 SCID inoculados con la línea tumoral de mama MDA-MB-231, utilizando un tratamiento de 10 mg/kg durante 20 días (Narla y col. 2001). Scrivens y col. describieron los efectos antitumorales de análogos del bisperoxovanadio sobre tumores mamarios xenotransplantados en ratones BALB/c, encontrando una inhibición del crecimiento del mismo utilizando 20 mg/kg del compuesto durante 25 días (Scrivens y col. 2003).

Para el caso de posibles terapias frente a cáncer de colon, Kanna y col. reportaron la prevención utilizando 4,27 μmol de monovanadato de amonio (20 mg/kg) durante 16 semanas frente a la carcinogénesis inducida por 1,2-dimetilhidrazina en colon de ratas machos Sprague-Dawley (Kanna y col. 2003).

Otros autores reportaron los efectos beneficiosos del monovanadato sobre las criptas, el adenoma y el adenocarcinoma de colon inducido por la 1,2-dimetilhidrazina en el mismo modelo de ratas machos utilizando 20 mg/kg de vanadio durante 32 semanas (Samanta y col. 2008).

Para aquellos tumores derivados de hígado se encontraron varios reportes de efectos de protección y antitumorales por parte del vanadio. Bishayee y col. reportaron los efectos del vanadio (20 mg/kg durante 16 semanas) sobre un modelo de ratas machos Sprague–Dawley inducidas con dietilnitrosamina, en la cual el metal reducía la incidencia, el número total, la multiplicidad y el tamaño de los focos y los nódulos generados en el hígado (Bishayee y col. 1995).

Efectos similares fueron reportados para el vanadio (4.27 $\mu\text{mol/L}$ 4, 12, 20 semanas en un modelo tumoral de hígado inducido por 2- acetilaminofluoreno, en el cual se evidenció una reducción de la incidencia y de la multiplicidad de los nódulos tumorales (Chakraborty y col. 2006).

Por otro lado, Wu y col reportaron los efectos inhibitorios de NaVO_3 (10 mg/kg, 15 mg/kg, 20 mg/kg, 21 días de tratamiento) sobre un modelo ortotópico de células de hepatocarcinoma en ratas.

Todos estos resultados evidencian el preponderante rol que ha tomado el vanadio como agente antitumoral en diversos modelos de cáncer en los últimos años. En estos se destacan las pruebas realizadas para cáncer de mama, colon e hígado, como los principales y también para leucemias y linfosarcomas (Bishayee y col. 2010).

Otro aspecto importante de recalcar es que la mayoría de los efectos biológicos reportados son para sales simples de vanadio(IV) o vanadio(V) en sus formas de catión vanadilo (VO^{+2}) y anión vanadato (VO_4^{-3}) y no para complejos de vanadio los cuales recién en los últimos años comenzaron a ser fuertemente estudiados. Hasta el día de la fecha no existen reportes relacionados a efectos del vanadio (tanto sales simples como complejos o

derivados como decavanadatos y vanadocenos) sobre modelos *in vivo* relacionados con osteosarcoma, siendo lo reportado en esta tesis doctoral el primer trabajo de investigación que relaciona a un compuesto de vanadio con sus efectos antitumorales frente al cáncer de hueso en un modelo animal.

Debido a los promisorios resultados obtenidos para las líneas derivadas de hueso tanto en sistemas *in vitro* como *in vivo*, se decidió probar los efectos de ambos complejos VOcris y VOsil en otra línea celular tumoral con mayor incidencia y prevalencia en la sociedad como son los tumores de colon.

Para esto se realizaron estudios sobre la viabilidad celular de la línea tumoral de adenocarcinoma colorectal humano (HT-29) que es una línea ampliamente utilizada para el estudio de acción de fármacos.

Los resultados mostraron una disminución sobre la viabilidad celular por parte de ambos complejos tanto a 75 como a 100 μM evidenciándose un mayor efecto deletéreo para el complejo VOsil por sobre VOcris. También se observó al igual que lo que ocurría para la línea de osteosarcoma, que los efectos antitumorales de los complejos fueron mucho mayores que los de los ligandos libres y que los del metal (VO^{+2}), demostrando una vez más el beneficio de la complejación para con la actividad biológica, lo cual podría eventualmente estar relacionado con una mayor biodisponibilidad, con un cambio de geometría estructural en el ligando y demás.

En busca de confirmar la relevancia de los efectos antitumorales encontrados para ambos complejos de vanadio se procedió a probar y comparar los mismos con los efectos del *cis*-Pt que es una droga de referencia para terapias oncológicas en clínica. Los resultados indicaron que el *cis*-Pt sólo tiene efectos sobre la viabilidad celular a 100 μM y esos efectos son mucho menores que los encontrados para ambos complejos de vanadio que generan un daño celular desde 75 μM a diferencia de lo ocurrido para el *cis*-Pt. Anteriormente hemos reportado los efectos biológicos de varios complejos de vanadio sobre diversas líneas tumorales de colon (Etcheverry y col. 2008, Di Virgilio y col. 2011, Arrambide y col. 2010). El próximo paso en el estudio de los efectos antitumorales causados por ambos complejos de vanadio fue la determinación de los mecanismos de acción implicados en la acción antitumoral observada. Para esto se estudiaron los efectos de los complejos sobre la relación GSH/GSSG, la inhibición de una enzima clave en la replicación del ADN como es la topoisomerasa y la apoptosis.

Anteriormente hemos mencionado la importancia que tiene el GSH en los mecanismos de defensa y desintoxicación celular frente a daños oxidativos, así como también que la relación GSH/GSSG es un buen indicador del estrés oxidativo (Hwang y col. 1992; Giovannini y col. 2008).

Los resultados evidenciaron una disminución de la relación GSH/GSSG para 75 y 100 μM de ambos complejos, pero observándose una disminución mayor para el complejo VOsil, lo cual es congruente con los efectos observados en los ensayos de viabilidad celular.

Continuando el estudio de los mecanismos de acción involucrados con las acciones deletéreas mostradas por ambos complejos sobre la línea HT-29 se estudió el efecto de estos complejos sobre la actividad de una enzima clave en la síntesis del ADN como la topoisomerasa IB. Las topoisomerasas son una familia de enzimas que tienen como principal función controlar la topología del ADN en procesos celulares que involucran entre otros, la replicación y la transcripción del ADN. Particularmente la topoisomerasa IB tiene un gran interés clínico ya que es uno de los blancos utilizados por diferentes quimioterapéuticos para ejercer sus efectos citotóxicos. Es por esto que analizamos la interacción existente entre los complejos de vanadio y la topoisomerasa IB y su actividad sobre un modelo de ADN plasmídico. Los resultados mostraron que sólo el complejo

VOsil generó un efecto inhibitorio sobre la actividad de la topoisomerasa IB desde 75 hasta 300 μM . Continuando con ese análisis se encontró que el efecto de la inhibición de la actividad de la topoisomerasa IB es reversible pero que el complejo interfiere en la interacción de la enzima con el ADN inhibiendo de esa manera su actividad y que este efecto se vió incrementado cuando se realiza una pre-incubación con el compuesto. Estos resultados evidenciaron la importancia de la interacción existente entre el complejo VOsil y la topoisomerasa IB como un nuevo blanco terapéutico relacionado con su acción sobre células tumorales en las cuales podría estar interfiriendo la normal actividad de esta enzima y generando así problemas en la síntesis del ADN como posible mecanismo de acción de muerte celular. Otros autores reportan efectos similares sobre la actividad de la enzima topoisomerasa de complejos de cobre y zinc(II) (Katkar y col. 2014).

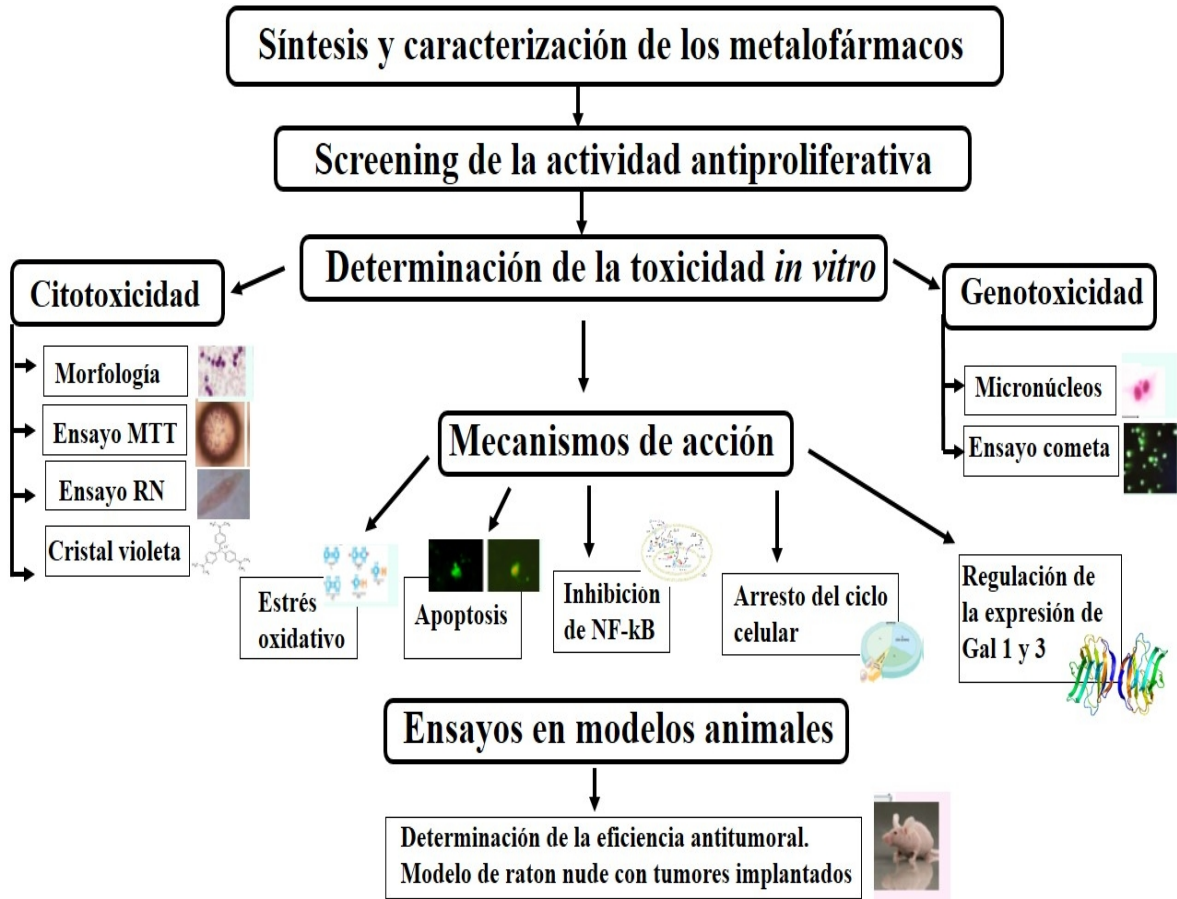
El arresto del ciclo celular y la apoptosis fueron otros de los mecanismos de acción estudiados para ambos complejos. Los resultados para el análisis del ciclo celular mostraron un arresto en fase G_2/M para el tratamiento realizado con 100 μM de VOcris tanto a 24 como a 48 h, y no se observó ningún arresto para el tratamiento realizado con VOsil. Los ensayos de apoptosis mostraron el efecto contrario, en el cual el complejo VOcris no generó un incremento de los niveles de células apoptóticas tempranas ni tardías medidas a través de la tinción con anexina V / IP ni una activación de la caspasa-3 mientras que VOsil incrementó los niveles de apoptosis y la activación consecuente de caspasa-3. Tanto a 6 h como a 24 h los niveles de células apoptóticas en estadio temprano o tardío fueron incrementados de forma secuencial, en paralelo a los niveles de caspasa-3. Del análisis del ciclo celular para el tratamiento por 24 y 48 h con VOsil se desprende que no existe arresto en ninguna fase por el mismo pero que se incrementa en un 30-40% la población celular correspondiente a la fracción del pico sub- G_1 que nos indica la ruptura y fragmentación del ADN que es un proceso característico de la apoptosis. Estos resultados son congruentes con lo observado para los demás mecanismos estudiados así como también para los resultados sobre la viabilidad celular en los cuales observamos un mayor efecto antitumoral por parte del VOsil sobre VOcris. Esos resultados se relacionan directamente con lo observado para los resultados de ciclo celular y apoptosis debido a que el complejo VOcris que posee un efecto menor sólo generó un arresto del ciclo celular sin enviar las células finalmente a apoptosis, mientras que el VOsil no indujo arresto del ciclo ya que envía directamente las células a apoptosis para que éstas mueran de forma programada. Existen escasos reportes sobre efectos de vanadio o derivados del mismo sobre líneas celulares tumorales de colon, los mismos sólo reportan niveles de citotoxicidad o daños sobre la viabilidad celular pero no estudios sobre los mecanismos de acción de los compuestos (Rhoads y col. 2010, Lewis y col. 2012).

Por último y para completar los estudios relacionados con la apoptosis se decidió estudiar el efecto de los complejos de vanadio sobre la regulación de la activación de la vía NF- κB utilizando la línea transfectada HT-29 NF κB -hrGFP.

Se conoce bien que muchos tipos de tumores humanos tienen activado el NF- κB producido por una desregulación o por una mutación que induce la expresión de los genes que evitan la muerte celular y protegen a las células, que deberían morir por apoptosis. Los defectos en NF- κB producen una mayor susceptibilidad a la apoptosis debido a que el NF- κB regula genes anti-apoptóticos como los TRAF1 y TRAF2 los cuales controlan la actividad enzimática de las caspasas que son fundamentales para la mayoría de los procesos apoptóticos.

Los resultados evidenciaron un efecto inhibitorio sobre la activación de la vía NF κB activada por TNF- α cuando se realizó una pre-incubación con 50 μM de VOsil demostrando como este complejo disminuyó de esta manera la posibilidad que tienen las células de defenderse frente a la apoptosis activando la vía NF κB y consecuentemente

genes anti-apoptóticos. Por otro lado, no se evidenciaron resultados de inhibición de la vía NFκB cuando tratamos con VOcris, lo cual es concluyente con los resultados que veníamos observando anteriormente. Diversos reportes datan la relación de otros metales de transición como el cobre o el níquel con la vía NFκB (Kenneth y col. 2014, Lil y col. 2012).



5. CONCLUSIONES

**“El montaje final es muy curioso”
JiJiJi, Octubre 1986, Patricio rey y
sus redonditos de ricota**

- Se sintetizaron y estudiaron desde el punto de vista biológico cinco complejos del catión vanadilo(IV) con los siguientes ligandos orgánicos: oxodiacetato (oda), 2,2 bipyridina (bipy), 1,10 fenantrolina (phen) y con los flavonoides crisina y silibinina, y dos complejos de vanadio(V), con derivados de hidroxilamina y dos aminoácidos como valina y metionina, así como de un HPOM de cobre.
- Los ensayos de citotoxicidad muestran que los complejos derivados de flavonoides estudiados fueron citotóxicos para las líneas de osteosarcoma con un nivel de selectividad alto para las células tumorales por sobre las de fenotipo normal. Este efecto también fue observado en un amplio rango de concentraciones para el HPOM de cobre testeado. Para el caso, de los derivados de oda estos muestran que el más activo fue el derivado de fenantrolina pero que este también generó daño sobre las células de fenotipo normal. Los complejos de vanadio(V) resultaron ser muy tóxicos y pocos selectivos sobre osteoblastos en cultivo, razón por la cual no se lo considera un compuesto promisorio para futuros ensayos biológicos. Además, los derivados de platino testeados muestran el mayor efecto inhibitorio de todos sobre la línea de osteosarcoma humano. Por otro lado, los complejos derivados de flavonoides fueron también activos sobre otro tipo de tumores como el adenocarcinoma colorectal.
- La morfología de las células se alteró luego de 24 horas de tratamiento con los complejos derivados de vanadio(IV) y luego de 6 y 24h para el caso del HPOM de cobre, observándose características propias de la apoptosis tales como condensación nuclear y citoplasmática, cromatina condensada sobre los bordes de la membrana nuclear, así como la formación de “burbujas de membrana”.
- La interacción y el daño sobre las hebras del ADN así como la generación de micronúcleos en las células aparecen como los mecanismos principales de genotoxicidad ejercidos por los complejos de vanadio y platino sobre las células de osteosarcoma humano en cultivo. En relación con esto cabe destacar la importante actividad nucleasa obtenida para los mismos en un modelo de ADN plasmídico.
- Nuestros estudios sugieren que los procesos citotóxicos de los complejos de vanadio y de platino estudiados así como del HPOM estarían mediados por la generación de ROS y por una alteración de la relación GSH/GSSG, así como a través de una alteración del potencial de membrana mitocondrial dado que la utilización de diversos antioxidantes permitió obtener una reversión parcial o total (dependiendo la concentración) del efecto antiproliferativo de los compuestos en cuestión en los osteoblastos en cultivo.
- El arresto del ciclo celular y la apoptosis aparecen como dos de los mecanismos más importantes utilizados por los complejos de vanadio, cobre y de platino estudiados en esta tesis. La relación existente entre el daño en el ADN, la generación de ROS y el arresto celular como la inducción de apoptosis para estos metalofármacos fue demostrada.
- Se estableció un modelo animal tumoral con la cepa de ratón **N:NIH(S) FoxItm** inoculada con la línea celular MG-63. Este mismo fue utilizado para demostrar las propiedades antitumorales de los metalofármacos. Los estudios *in vivo* con el

complejo de vanadio con crisina (VOcris) frente al osteosarcoma humano evidenciaron efectos farmacológicos promisorios reduciendo el volumen tumoral al finalizar el periodo de tratamiento. Además, se observó que el mismo no generó efectos adversos sobre los animales, lo cual lo convierte en un potencial compuesto antitumoral.

- En resumen, los resultados presentados en este trabajo de tesis doctoral indicarían que los complejos de vanadio(IV), los de platino y el HPOM de cobre ejercen sus efectos citotóxicos a través de alteraciones morfológicas induciendo mecanismos de muerte que conllevan a un aumento del estrés oxidativo, una disminución de los niveles de GSH con el consecuente arresto del ciclo celular y/o la inducción de apoptosis. Así mismo estos compuestos inducen daños genotóxicos que están relacionados con los efectos citotóxicos observados posteriormente. Por último, cabe destacar la importancia de los efectos antitumorales encontrados *in vivo* para uno de los compuestos de vanadio(IV) con crisina que lo coloca como el más promisorio de los agentes antineoplásicos no derivados de platino estudiados en esta tesis para el tratamiento oncológico del osteosarcoma.

6. METODOLOGIA

“La buena felicidad dicen que no se nota” Scaramanzia, Ultimo bondi a finisterre 1998, Patricio rey y sus redonditos de ricota

6.1 Síntesis de Polioxometalatos

6.1.1 $K_{10}[M_4(H_2O)_2(PW_9O_{34})_2] \cdot 20H_2O$

La síntesis de los heteropolitungstatos complejos de fórmula general $K_{10}[M_4(H_2O)_2(PW_9O_{34})_2] \cdot 20H_2O$ con $M=Co^{+2}$, Zn^{+2} , Cu^{+2} y Mn^{+2} se realizó en medio acuoso. La misma se inició partiendo de isopolitungstatos simples ($H_3PW_{12}O_{40}$) en solución acuosa los cuales por condensación dieron el producto buscado en dos etapas. La primera de ellas consistió en la preparación, a partir de $Na_2WO_4 \cdot 2H_2O$, de un precursor lacunar de fórmula $\Delta-Na_8HPW_9O_{34} \cdot 19H_2O$ ($\Delta-PW_9$), reportada por Massart y col., por precipitación en medio ácido (Massart y col. 1977)

La segunda etapa incluyó agregar una cantidad estequiométrica del precursor ($\Delta-PW_9$) a una solución de la sal del metal divalente correspondiente (Co^{+2} , Zn^{+2} , Cu^{+2} y Mn^{+2}). Luego de aproximadamente 12 h el heteropolitungstato se obtiene como un precipitado policristalino.

En base a la técnica reportada por Massart y col., para preparar 23 g de producto (80% de rendimiento) se disolvieron $Na_2WO_4 \cdot 2H_2O$ (30 g) en agua destilada, a esta solución se agregó H_3PO_4 al 85% (0,75 mL) seguida de ácido acético glacial (5,5 mL) para proveer el pH adecuado. De esta manera se obtuvo un precipitado blanco, el cual se filtró y se lavó. Este precipitado corresponde mayoritariamente a la estructura isomérica denominada ΔPW_9 , a la cual se le realizó una termólisis parcial (calcinación suave del precursor (ΔPW_9) a $80^\circ C$ por tres días al aire) que conduce al precursor necesario para la síntesis de los heteropolianiones $[M_4(H_2O)_2(PW_9O_{34})_2]^{10-}$.

La preparación de las sales potásicas de los distintos heteropolitungstometalatos $[M_4(H_2O)_2(PW_9O_{34})_2]^{10-}$ ($M= Co, Zn, Cu$ y Mn) se llevó a cabo disolviendo 1,4 mmol de la sal del metal divalente en agua destilada, a estas soluciones se agregaron 0,72 mmol del precursor $\Delta-PW_9$, tratado térmicamente, calentando a aproximadamente $100^\circ C$, agitando y agregando un exceso de KCl (4g) para obtener el precipitado de la sal potásica tras lo cual se deja enfriar en reposo. Una vez enfriada la mezcla hasta temperatura ambiente, se filtró al vacío con buchner y se lavó con agua destilada.

El producto se purificó por recristalización para lo cual se disolvió en agua a temperatura entre $80-100^\circ C$ y se dejó cristalizar durante 24 h. Se recolectaron los cristales por filtración y se dejaron secar a temperatura ambiente (Finke y col. 1987).

6.2 Síntesis de los compuestos de platino

6.2.1 CR-163

Para la síntesis de este compuesto de platino, se partió del ligando 8-aminoquinolina correspondiente, a la cual se le agregó en una mezcla de solventes metanol/acetona 2:1 el compuesto de platino $PtCl_2(DMSO)_2$ manteniéndose por 24 h en agitación a temperatura ambiente. La solución obtenida se filtró y lavó con agua fría y el complejo obtenido fue secado al aire, con un rendimiento del 95%. (Martin Santos y col. 2013)

6.2.2 CR-175

Para la síntesis de este compuesto se partió de la 8 hidroxiquinolina correspondiente a la cual se le agregó hidróxido de sodio (NaOH) para producir su activación nucleofílica y evitar la formación de un puente de hidrógeno intramolecular. Para esto se adicionaron 1,05 equivalentes del ligando con 1,2 equivalentes de NaOH en una mezcla de solventes

metanol/acetona 1:2. Luego se adicionó el compuesto de platino $\text{PtCl}_2(\text{DMSO})_2$ y se dejó durante 24 h en agitación a temperatura ambiente. Posteriormente la solución obtenida se filtró y se lavó el precipitado con agua fría y el compuesto fue secado al aire, obteniéndose un rendimiento del 86%. (Martin Santos y col. 2013)

6.3 Síntesis de los compuestos de vanadio

6.3.1 Vanadio (V)

6.3.1.1 $[\text{VO}(\text{NH}_2\text{O})_2(\text{aa})]$

Para la síntesis de los complejos $[\text{VO}(\text{NH}_2\text{O})_2(\text{val})]$ y $[\text{VO}(\text{NH}_2\text{O})_2(\text{met})]$ se utilizó un procedimiento reportado por Piro y col. 2011. Para esto se colocaron 5 mM de NH_4VO_3 junto con una cantidad variable de NaOH suficiente para neutralizar (estimadas por valores de pK y de curvas de titulación de los aminoácidos) el agregado de $\text{NH}_2\text{OH} \cdot \text{HCl}$ que se disuelve en un volumen mínimo de agua destilada (aprox 20 mL). La solución correspondiente a cada aminoácido fue agregada en una relación aproximada de 3:1 aminoácido / NH_4VO_3 . La solución obtenida fue enfriada a 4 °C y el sólido $\text{NH}_2\text{OH} \cdot \text{HCl}$ fue agregado en una proporción 5:2 $\text{NH}_2\text{OH} \cdot \text{HCl}$ en condiciones de agitación constante hasta disolución completa. La solución obtenida se mantuvo a 4°C y la precipitación ocurrió después de unas pocas horas. El precipitado fue separado por filtración y luego lavado con pequeñas porciones de agua fría y etanol absoluto y secado en vacío.

6.3.2 Vanadio (IV)

6.3.2.1 $[\text{VO}(\text{oda})] 2\text{H}_2\text{O}$, $[\text{VO}(\text{oda})(\text{bipy})] \cdot \text{H}_2\text{O}$ y $[\text{VO}(\text{oda})(\text{phen})] \cdot 1.5\text{H}_2\text{O}$

El complejo del catión vanadilo(IV) con oxodiacetato (oda), fue sintetizado de acuerdo a lo reportado por Del Rio y col. 2000. Brevemente, se mezcló en 100 mL de agua destilada acetilacetato de vanadilo $\text{VO}(\text{acac})_2$ (10,6 g, 40 mmol) y oxodiacetato $\text{O}(\text{CH}_2\text{COOH})_2$ (5,36 g, 40 mmol). La mezcla se calentó a reflujo por tres horas y la solución caliente fue filtrada y concentrada, luego se deja enfriar lentamente. Se obtuvieron cristales azules que se lavaron con acetona y éter etílico.

El complejo $[\text{VO}(\text{oda})(\text{phen})] \cdot 1.5\text{H}_2\text{O}$ fue obtenido mezclando 0.14 g (0.8 mmol) de o-fenantrolina sólida con 20 mL de solución acuosa conteniendo 0.18 g (0.8 mmol) del compuesto precursor ($[\text{VO}(\text{oda})]2\text{H}_2\text{O}$) bajo condiciones de agitación intensa. El precipitado verde obtenido fue posteriormente filtrado, lavado con agua fría y secado al aire. Por otro lado, el complejo $[\text{VO}(\text{oda})(\text{bipy})] \cdot \text{H}_2\text{O}$ fue obtenido mezclando 0.176 g (1 mmol) de 2-2'-bipiridina sólida con 10 mL de una solución metanólica conteniendo 0.235 g (1 mmol) del compuesto precursor. El precipitado verde obtenido fue filtrado y lavado con pequeñas porciones de metanol frío y secado al aire según lo reportado Álvarez y col. 2010.

6.3.2.2 $[\text{VO}(\text{crisina})_2\text{EtOH}]_2$

El complejo del catión vanadilo(IV) con el flavonoide crisina fue sintetizado según lo reportado por Naso y col. Para la síntesis del complejo se disolvió 1mmol de crisina en 5mL de etanol con agitación continua. Sobre la solución se agregaron 0,5 mmoles de $\text{V}(\text{IV})\text{O}(\text{acac})_2$ sólido en pequeñas porciones manteniendo constante la agitación. La solución resultante (pH=5) se colocó a reflujo durante 1,30 h. Pasado ese tiempo se observó la formación de un precipitado color verde que se filtró en vacío y se lavó varias veces con etanol absoluto para luego ser secado al aire (Naso y col. 2010).

6.3.2.3 Na₂[VO(silibinina)₂] 6H₂O

La síntesis del complejo entre el catión vanadilo(IV) con el flavonoide silibinina fue realizada en una solución etanólica de silibinina (0,25mmoles en 10 mL) a la cual se agregaron 0,125 mmoles de una solución acuosa de VOCl₂ (50%). Se ajustó el pH de la solución resultante a un valor de 9 utilizando NaOCH₃ sólido y se mantuvo bajo calentamiento suave y agitación durante 1 hora. Luego de ese lapso se observó la formación de un precipitado verde que posteriormente se filtró y lavó al menos 3 veces con etanol absoluto. Se dejó secar en estufa a 60 °C (Naso y col. 2011).

6.4 Ensayos de solubilidad

Estos ensayos se llevaron a cabo con el fin de determinar el solvente adecuado para preparar las soluciones *stock* y de trabajo.

El ensayo se llevó a cabo pesando 10 mg de los compuestos y agregando volúmenes crecientes de los siguientes solventes: agua, DMEM, etanol, etanol / agua (1:1) y dimetilsulfóxido (DMSO). Este ensayo se realizó a temperatura ambiente (Ta). Al elegir los solventes se tuvo en cuenta que los mismos fuesen miscibles con agua y compatibles con los estudios biológicos. En los ensayos biológicos realizados la máxima concentración de DMSO utilizada fue el 0,5%.

6.5 Estudios de estabilidad

6.5.1 Estabilidad en fase sólida

Los estudios de estabilidad en fase sólida se realizaron utilizando espectroscopía IR. Los compuestos recién sintetizados fueron identificados por esta técnica y conservados en estufa a 60°C. El estudio se llevó a cabo analizando los compuestos periódicamente por espectroscopía IR usando la técnica de la pastilla en KBr con una humedad relativa correspondiente a la ambiental. Se compararon las posiciones relativas de las bandas, la relación entre bandas, así como también la existencia de nuevas bandas que sugieran degradación de los complejos.

6.5.2 Estabilidad en solución

Con el fin de evaluar la estabilidad de los complejos en solución, se utilizaron diferentes condiciones. Basados en los ensayos de solubilidad, se prepararon soluciones de concentración 5 mM en diversos solventes como: agua destilada, DMSO, etc.

El estudio se llevó a cabo midiendo el espectro UV-visible de los complejos a distintos tiempos (0 – 24 h) en las condiciones antes mencionadas. Se evaluó la degradación de los mismos en función del tiempo analizando la desaparición y/o pérdida de intensidad de las bandas de absorción características de cada compuesto.

6.6 Ensayos *in vitro*

6.6.1 Cultivos Celulares

6.6.1.1 MC3T3-E1

La línea celular clonal MC3T3-E1 derivada de calvaria de ratón es un modelo bien definido para el estudio *in vitro* del desarrollo osteoblástico normal (Fratz-Zelman y col. 1997, Suzuki y col. 2002).

6.6.1.2 UMR106

UMR106 es una línea celular osteoblástica clonal derivada de un osteosarcoma de rata (Chak y col. 1995). Esta línea celular expresa varios marcadores osteoblásticos, entre ellos fosfatasa alcalina (FAL) y síntesis de colágeno tipo I según lo reportado por Partridge y col 1983.

6.6.1.3 MG-63

MG-63 es una línea celular clonal osteoblástica derivada de un osteosarcoma humano. Esta es una línea tipificada de osteoblastos y de acuerdo a la literatura es un buen modelo y una de las líneas celulares más utilizadas en el estudio del cáncer óseo (Mohseny y col. 2012, Pautke y col. 2004).

6.6.1.4 HT-29

HT-29 es una línea celular clonal de adenocarcinoma colorectal humano que fue aislada de un tumor primario por Fogh (Fogh. 1975), con capacidad de diferenciación *in vitro* hacia un fenotipo mucosecretor obtenido por (Lesuffleur T ET AL 1990). Las células HT-29 son negativas para CD4 pero poseen la expresión en superficie de un receptor de galactosa. Por otro lado, esta línea celular es positiva en cuanto a la expresión de una serie de oncogenes como *c-myc*, *K-ras*, *H-ras*, *N-ras*, *Myb*, *sis* y *fos* (Trainer y col. 1988) Además en esta línea celular se sobreproduce el antígeno p53 que posee una mutación en el codón 273 que le genera una sustitución de arginina por histidina.

Esta línea celular se encuentra dentro del panel NCI 60 de líneas celulares cancerosas humanas provenientes de nueve tejidos diferentes entre los cuales se encuentra el colon y el pulmón que están dentro del programa DTP (*Developmental Therapeutics Program*) del NCI (*National Cancer Institute, USA*).

6.6.1.5 HT-29-NFκB-hrGFP

HT-29 NFκB-hrGFP es una línea celular clonal de adenocarcinoma colorectal humano transfectada con el gen del *NFκB*. Esta línea fue utilizada para el estudio de la activación de la vía del NF-κB y su correlación con la regulación de la progresión del ciclo y la muerte celular (Guimarães y col. 2010).

6.6.1.6 Células mononucleares de sangre periférica

Las células mononucleares de sangre periférica son células sanguíneas caracterizadas por poseer un único núcleo redondo, como los linfocitos o los monocitos. Estas células

sanguíneas son un componente crítico en el sistema inmune, concretamente para combatir las infecciones y tiene vastos usos clínicos y en investigación.

6.6.2 Condiciones de cultivo

Todas las líneas celulares fueron cultivadas en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado con 10 % de suero fetal bovino (SFB), penicilina (100 UI / mL) y estreptomicina (100 µg / mL) en atmósfera humidificada con 5 % CO₂. Cuando la monocapa celular alcanzó la subconfluencia, se despegaron de la superficie del frasco de cultivo con 0,25 % de tripsina en PBS a pH = 7,4 - 1mM EDTA o con Tryple™ y se resuspendieron en DMEM - 10 % SFB. Para el cultivo de células mononucleares de sangre periférica, la sangre fue extraída de pacientes sanos y normales con heparina (20u/mL) y fueron aisladas con Ficoll-Paque en partes iguales luego de 30 minutos de centrifugación. Luego de extraer la interfase en la cual se encuentran los linfocitos, fueron cultivados en medio Roswell Park Memorial Institute (RPMI) con fitohemaglutinina (0,03 mL/mL) por 72 h a 37 °C, para luego proceder con los ensayos de viabilidad celular.

6.7 Ensayos de viabilidad celular y citotoxicidad

6.7.1 Ensayo del cristal violeta

Este ensayo tiene como fin evaluar los efectos sobre la viabilidad celular de los distintos compuestos, estudiándose el efecto de la concentración de los potenciales agentes terapéuticos (Okajima y col. 1992). Con el fin de evaluar el efecto de la concentración de distintos complejos sobre la viabilidad celular, las células cultivadas en platos de 48 pocillos (3x10⁴ Células/pocillo por 24 h, se incubaron con diferentes concentraciones de las drogas en estudio en DMEM sin Suero Fetal Bovino (SFB) durante 24 h.

Luego, la monocapa celular se lavó con PBS, se fijó durante 5 min con 5 % glutaraldehído en PBS y se tiñó con 0,5 % cristal violeta en metanol al 30 %. El exceso de colorante se lavó exhaustivamente con agua destilada, los platos se secaron al aire y el colorante se extrajo con buffer 0,1 M glicina / HCl (pH = 3) / 30 % metanol. La absorbancia del extracto se midió a 540 nm. Previamente nuestro grupo demostró la correlación entre el recuento de células vivas en cámara de Neubauer y este método espectrofotométrico (Cortizo y Etcheverry 1995). Además, para confirmar el rol del estrés oxidativo en la viabilidad celular se realizaron incubaciones en presencia de agentes capaces de captar las ROS tales como una mezcla de vitaminas C y E (50 µM de cada una) durante 24 h junto a las distintas concentraciones de los compuestos testeados. Para chequear el rol y la importancia del GSH en la viabilidad celular se realizaron preincubaciones con 1 mM de GSH por 2 h para luego colocar las dosis correspondientes de los compuestos y continuar con la técnica de viabilidad celular ya descrita.

6.7.2 Estudio de la funcionalidad mitocondrial. Ensayo de MTT.

La viabilidad celular también puede ser evaluada a través de la funcionalidad mitocondrial mediante la conversión de la sal de tetrazolio (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio, MTT) a un compuesto coloreado insoluble (formazán) por deshidrogenasas mitocondriales. Las células se subcultivaron en placas de 96 pocillos (20000 células/pocillo) a 37 °C con 5% CO₂ bajo diferentes condiciones experimentales. Luego del tratamiento, las células se incubaron con la sal de tetrazolio (0,5 mg/mL) por 3 h. Posteriormente, este medio se descartó, se lavó con PBS y el formazán formado por

las enzimas mitocondriales se extrajo con DMSO. Se agitó por 10 minutos y se realizó la lectura de la absorbancia en lector de placas a 570 nm. (Mosmann T. 1983)

6.7.3 Ensayo de Rojo neutro.

La citotoxicidad de los compuestos puede ser abordada a través de pruebas cuyo fundamento es la absorción de colorantes supravitales como el Rojo neutro que presenta gran afinidad por los lisosomas (Babich y Borenfreund, 1992). Esta prueba se basa en la detección de los daños que producen los compuestos tóxicos sobre la integridad de la membrana de los lisosomas. La acumulación del Rojo Neutro ocurre por fijación de la forma protonada del colorante dentro del ambiente ácido del lisosoma o por unión del Rojo Neutro a cargas ácidas fijas, tales como polisacáridos ácidos dentro de la matriz del lisosoma. Una disminución en la capacidad de las células para retener el colorante en el interior de los lisosomas indica de la pérdida de viabilidad celular. Brevemente, las células se subcultivaron en placas de 96 pocillos (20000 células/pocillo), y se trataron con la sustancia de interés a 37 °C con 5% CO₂. Luego del tratamiento, el medio se reemplazó por otro que contuvo 100 µg/mL de Rojo Neutro por 3 h. Este medio se descartó, se lavó con PBS y el colorante captado por los lisosomas se extrajo con solución (50% etanol, 1% ácido acético). Se agitó por 10 minutos y se leyó la absorbancia en lector de placa a 540 nm (Borenfreund E. 1984).

6.7.4 Estudios morfológicos

La evaluación de la morfología celular se realizó por medio de la observación microscópica de los cultivos celulares control comparados con cultivos sometidos a los diferentes tratamientos con los compuestos. Las células fueron subcultivadas en placas de 6 pocillos (100.000 células/pocillo) fijadas con metanol durante 5 min y teñidas por 10 min con el colorante Giemsa; luego de lavar exhaustivamente la monocapa celular se la montó y observó usando un microscopio óptico. Se evaluaron las características del citoplasma y del núcleo, presencia de contactos celulares, etc. (Rivadeneira y col. 2010).

6.8 Ensayos de genotoxicidad

6.8.1. Estudios de fragmentación de ADN. Ensayo Cometa.

El ensayo de electroforesis de una única célula (Ensayo Cometa) es utilizado para detectar quiebres simples y dobles del ADN y sitios lábiles al álcali (Singh y col. 1988). Para ello, se subcultivaron las células en placas de 12 pocillos (40000 células/pocillo) y fueron tratadas con el compuesto de interés. Luego las células se resuspendieron en 80 µl 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. Estos 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, 100 mM Na₂EDTA, 1% Triton X-100, pH 10) al menos por 1 h. Luego, se colocaron los portaobjetos en buffer de electroforesis (Na₂EDTA, 0,3 M NaOH, pH 12,7) por 20 minutos y se realizó la corrida a 25 V por 30 minutos a 4°C. Luego, los preparados se neutralizaron, tiñeron con SYBR Green y se analizaron en microscopio de fluorescencia (λ excitación = 498 nm y en λ emisión = 522 nm). La bleomicina fue utilizada como control positivo. Las células con mayor daño del ADN mostraron mayor migración del material genético que se puede visualizar como “colas” de un cometa. Se midieron la longitud 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.

6.8.2. Ensayo de micronúcleos (MN)

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

Se llevó a cabo según lo descrito previamente por Di Virgilio y col. 2004.

Brevemente, las células se sembraron en placas de 6 pocillos (4×10^4 células/ pocillo) por 24 h. Se cambió el medio por otro que contiene la sustancia de interés y citocalasina B (3 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y se incubó a 37 °C en 5% CO_2 . Luego del tratamiento, se las trató con solución hipotónica y posteriormente fueron fijadas con metanol-ácido acético (3:1). Los preparados se secaron y se tiñeron con Giemsa 5% para la observación al microscopio. Se analizaron 500 células binucleadas por pocillo (Fenech, 2000).

6.9 Estudio de los mecanismos de acción

6.9.1 Clivaje de ADN plasmídico en geles de agarosa

Para los experimentos de electroforesis en gel de agarosa se utilizó el ADN plasmídico pA1. Éste es un ADN de cadena larga proveniente del citocromo P450 (CYP3A1) insertado en el vector plasmídico PBS ((pBluescribe, Stratagene, UK) descrito por Fisher y col. El ADN plasmídico fue amplificado en la bacteria *Escherichia Coli* DH5a y purificado utilizando el sistema miniprep Pure Yield™ de Promega. El control de linealización fue obtenido por digestión del pA1 con la enzima *Hind III* y usado como referencia en la electroforesis. En algunas ocasiones se utilizó como referencia de la forma lineal, una muestra de ADN plasmídico digerida con 50 μM de acetilacetato de vanadilo(IV) ($\text{VO}(\text{acac})_2$).

Para realizar los experimentos se preparó una solución *stock* de 200 μM de los complejos y posteriormente se realizaron las diluciones correspondientes a las concentraciones testeadas (5-100 μM) en agua Milli-Q desionizada. La actividad de clivaje del ADN fue monitoreada mediante la conversión del ADN plasmídico superenrollado en ADN circular mellado (*nickeado*) y lineal. La mezcla de reacción contiene 6 μL de agua, 2 μL (0,2 μg) de ADN plasmídico superenrollado (pA1), 2 μL de una solución buffer (ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico (MOPS)/ NaOH y $\text{PO}_4^{3-}/ \text{HNO}_3$) (100 mM, pH 7) y 10 μL de una solución acuosa del complejo de interés. El volumen final de reacción es de 20 μL y las concentraciones evaluadas fueron 5, 10, 25, 50 y 100 μM , que corresponden a diferentes relaciones metal-ADN (pb): 0,33; 0,67; 1,7; 3,3 y 6,7. Luego de la digestión de las muestras a 37°C por 1 h, la reacción fue detenida y las muestras fueron corridas en un gel de agarosa (1%) con bromuro de etidio (3 $\mu\text{g}/\text{mL}$). La electroforesis fue desarrollada durante 3 h a 100 V y los geles fueron expuestos a luz UV y fotografiados usando el programa AlphaImager®, para luego ser procesados por densitometría utilizando el software AlphaEaseFCTM, Alpha Innotech),

El ácido mercaptopropiónico (MPA) y la oxona (KHSO_5) fueron elegidos como agentes activantes reductores y oxidantes respectivamente (concentración final = 200 μM). Las

muestras control de agentes activantes se preparan en ausencia de complejos metálicos. Para verificar los efectos de la actividad nucleasa de los complejos de vanadio y su relación con la generación de ROS se utilizó una serie de *scavengers* (NaN₃, NaBz y DMSO, Stock 400 mM) y H₂O₂ (Stock 1 mM).

6.9.2 Inhibición de la actividad de la htopoisomerasa IB

6.9.2.1 Inhibición de la actividad enzimática de la htopoisomerasa IB

Para el ensayo correspondiente se utilizó la proteína humana topoisomerasa IB expresada de forma recombinante. Los ensayos de relajación del ADN fueron llevados a cabo incubando la enzima con 0,5µg del plásmido comercial pBlue-script KSII(+) en 30 µL de buffer de reacción (20Mm Tris- HCl, 0,1mM Na₂EDTA, 10 mM MgCl₂ , 50 µg/mL BSA acetilada, 150 mM KCl, Ph 7,5). El efecto de los complejos sobre la actividad topoisomerasa fue medido agregando diversas concentraciones del mismo y a diferentes tiempos. La reacción fue detenida luego de 30 min a 37 °C con 0,5% de SDS y se realizó una corrida electroforética en un gel de agarosa 1% en 50 mM de Tris, 45 mM de ácido bórico, 1 mM EDTA.

Ciertos ensayos se realizaron preincubando la enzima y el complejo por 5 min a 37 °C para luego adicionar el sustrato (ADN plasmídico) y la posterior incubación de 30 min a 37 °C.

6.9.2.2 Interacción entre la htopoisomerasa IB y el ADN. Ensayo de movilidad electroforética (EMSA).

El ensayo de movilidad electroforética fue realizado utilizando un oligonucleótido doble hebra de ADN de 25 pares de bases con la siguiente secuencia:

Cl 25 5' [γ-³²P]ATP GAAAAAAGACTTAGAAAAATTTTTA 3'

Cp 25 5' TAAAAATTTTCTAAGTCTTTTTTC 3'

La hebra Cl 25 se encuentra radiomarcada en la posición 5'.

Las reacciones de incubación fueron llevadas a cabo con la enzima htopoisomerasa en condiciones estándar [20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.1 mM Na₂EDTA, 10 mM MgCl₂, 50 µg/mL BSA acetilado y 150 mM KCl] en presencia de DMSO (0,5%), 150 µM VOsil por 30 min a 37 °C en un volumen final de 20 µL. Para el caso de la pre-incubación con VOsil, la enzima fue pre-incubada por 5 min con el complejo antes del agregado del ADN sustrato y luego por 30 min a 37 °C. La reacción fue detenida agregando 5 µL de colorante [0.125% azul de bromofenol y 40% (v/v) glicerol] y corridas en un gel nativo de poliacrilamida (6%) a 40 V en

TBE3 (12 mM Tris, 11.4 mM ácido bórico y 0.2 mM EDTA) por 4 h a 4 °C. Los productos obtenidos fueron visualizados en el PhosphorImager.

6.9.3 Estrés oxidativo. Determinación de la formación de especies de oxígeno reactivas (ROS).

Las ROS 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 ROS 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 $\text{ONOO}^- / \text{ONOOH}$, 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 (Kooy y col, 1994). El experimento se realizó en placas de 24 pocillos ($1,5 \times 10^5$ células/pocillo) en DMEM con 10% de SFB por 24 h. A continuación, se las incubó en DMEM a 37°C con concentraciones crecientes de los complejos durante el tiempo de incubación correspondiente. Luego, cada pocillo se lavó dos veces con solución salina buffer de Hank (HBSS) y se incubó 30 min con DHR ($1 \mu\text{g}/\text{mL}$) en HBSS con el fin de permitir el ingreso de la sonda fluorescente al citoplasma y su posterior oxidación. Finalmente, las células fueron lisadas con 1 mL de 0,1 % Tritón - X100 y se midió la intensidad de fluorescencia del extracto celular en un espectrofluorómetro, usando como estándar $0,5 \mu\text{M}$ de RH (Cortizo y col. 2000). A una alícuota de cada extracto celular se le determinó el contenido total de proteínas por pocillo por el método de Bradford (Bradford, 1976) o por el método del ácido bicinónico (BCA) (Smith y col. 1985). 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).

6.9.4 Estudio del status redox celular a través de la medición de la relación de glutation reducido (GSH) y oxidado (GSSG).

El GSH es uno de los principales agentes reductores en células de mamíferos, al oxidarse produce GSSG. Los niveles celulares de GSH y GSSG se determinaron por fluorescencia y la relación GSH/GSSG fue utilizada como un marcador del estado redox celular. Para esto, las células fueron crecidas en placas de 24 pocillos ($1,5 \times 10^5$ células/pocillo) por 24 h a 37°C . Luego la monocapa se lavó con PBS y se recolectaron con $250 \mu\text{L}$ de Triton 0,1% por 30 min. Para la determinación de GSH, $100 \mu\text{L}$ de las alícuotas se mezclaron con 1.8 mL del buffer (Na_2HPO_4 0.1 M-EDTA 0.005 M pH 8) frío y $100 \mu\text{L}$ μL o-phthaldialdehido 0.1 % en metanol) descrito anteriormente por (Hissin y Hilf 1976). Para el caso del GSSG, se tomó $100 \mu\text{L}$ de la alícuota y se mezcló con 1.8 mL NaOH 0.1 M y o-phthaldialdehido. Previamente, para evitar la oxidación del GSH los extractos celulares fueron incubados con 0,04 M de N-etilmaleimida (NEM). La fluorescencia fue medida a 420 nm luego de realizar la excitación a 350 nm. La relación GSH/GSSG fue calculada como el % basal de todas las condiciones experimentales ensayadas.

6.9.5 Análisis de arresto del ciclo celular

Las células fueron crecidas en placas de 6 pocillos y cultivadas durante 24 h para luego ser tratadas con diferentes concentraciones de los complejos e incubadas a diferentes tiempos (6, 16, 24 y 48 h). Posteriormente las células fueron lavadas con PBS, fijadas y permeabilizadas con etanol 70% frío por 2 h y teñidas con buffer de tinción preparado en el momento ($15 \text{ mg}/\text{mL}$ de IP (Ioduro de Propidio), $15 \text{ mg}/\text{mL}$ RNasa libre de DNasa preparado en PBS con 2mM EDTA) e incubada por 15 min a 37°C . Luego de eliminar los agregados celulares previo filtrado, el análisis de la distribución del ciclo celular fue realizada con el citómetro de flujo CyAn™ ADP utilizando para el registro de datos el

software Summit v4.3. Para cada muestra se adquirieron 10,000 eventos. El porcentaje de células en G₁/G₀, S, G₂/M fases fue calculado utilizando el FlowJo 7.6 software (Modelo Watson).

6.9.6 Estudios de Apoptosis

6.9.6.1 Evaluación de la morfología apoptótica

En los estadios finales del proceso apoptótico las células presentan diferentes características morfológicas tales como: burbujas o globos de la membrana plasmática, pérdida de contacto con células vecinas y con la matriz extracelular. Adicionalmente se puede presentar una fragmentación y posterior condensación de la cromatina en el borde del núcleo (van Engeland y col. 1997).

En este ensayo las células fueron subcultivadas en placas de 6 pocillos (100.000 células/pocillo) con cubreobjetos por 24 h para luego incubarse con distintas dosis de los complejos a diferentes tiempos. Luego se fijaron con etanol absoluto frío durante 5 min y se bloquearon con 2% albumina sérica bovina (BSA) por 2 h. Posteriormente, se lavaron con PBS y las muestras se tiñeron con Faloidina-FITC por 2 h, seguido de una tinción por 15 min con ioduro de propidio (IP 5 µg/mL). Finalmente se observaron al microscopio confocal Leica TCS SP5. Por otro lado, se realizó el mismo protocolo pero utilizando una tinción con DAPI y Cell Mask™ para luego ser visualizado en el mismo microscopio.

6.9.6.2 Evaluación de la externalización de fosfatidil serina

La fase temprana de la apoptosis celular se caracteriza por la relocalización de fosfatidil serina (PS) en la superficie celular y puede ser fácilmente detectada por medio de la tinción con anexina V, una proteína que naturalmente tiene alta afinidad por la PS (Varga y col. 1999).

Las células cultivadas por 24 h en placas de 12 pocillos (1,5x10⁵ células/pocillo) fueron incubadas a diferentes tiempos con los distintos compuestos. Luego fueron levantadas con TryPLE™, centrifugadas y lavadas con PBS para posteriormente ser incubadas con anexina V (1 µg /mL) y ioduro de propidio (IP; 2,5 µg / mL) en buffer de unión (10 mM HEPES / 140 mM NaCl / 2,5 mM CaCl₂, pH = 7,4). Las células fueron analizadas utilizando el citómetro de flujo CyAn™ ADP (Beckman Coulter, USA) y el software utilizado fue el Summit v4.3 en algunos ensayos y en otros el citómetro BD FACS Calibur™ y el software FlowJo 7.6. Para cada análisis se tomaron 10.000 eventos del *Gate* FSC vs SSC.

6.9.6.3 Evaluación del contenido de ADN (pico Sub-G1) en el análisis del ciclo celular.

Se utiliza el mismo procedimiento que para el análisis de ciclo celular (**Sección 6.9.5**) El porcentaje de células en la fracción del pico sub-G1 fue calculado utilizando el FlowJo 7.6 software (Modelo Watson).

6.9.6.4 Análisis de activación de caspasa-3

La determinación de caspasa-3 (una de las principales caspasas efectoras) fue llevada a cabo por 2 métodos: por un método colorimétrico (Caspase 3 Assay Kit Colorimetric™, SIGMA) y otro fluorométrico o fluorimétrico (Caspasa 3 Assay Kit Pharmingen™, BD).

Para el primer caso las células fueron crecidas en botellas de cultivo de 25cm² a 37°C por 24 h (2.5 x10⁶ células), donde luego se incubó la monocapa crecida con diferentes concentraciones de los complejos de vanadio por 6 h. Luego de ese tratamiento la monocapa es lavada con PBS y las células fueron cosechadas con TrypLE™ a 37° C por 5 min. Posteriormente se agregó buffer de lisis 1X y se incubó en agua-hielo por 15 min, para luego ser centrifugado (17000 rpm, 15 min) y recolectado el sobrenadante.

En un último paso se realizaron las mezclas de reacción correspondientes de acuerdo a lo especificado por el fabricante y se realizó la lectura de absorbancia a 420 nm.

Para el segundo caso las células fueron crecidas en placas de 24 pocillos (3x10⁵ células/pocillo) a 37°C por 24 h. Luego se incubaron con diferentes concentraciones de complejo a diferentes tiempos de acuerdo con el ensayo planteado.

Acto seguido, se colectaron las células siguiendo el mismo procedimiento empleado en el ensayo colorimétrico para después ser fijadas con citofix/citoperm por 20 min en hielo. Posteriormente se realizó una centrifugación (1000 rpm, 5 min) y se añadió el anticuerpo anti caspasa-3 FITC (10 µL por muestra) y se incubó por 30 min a temperatura ambiente. Después de la incubación se centrifugó, se lavó con buffer de lavado y se adquirieron las muestras en el citómetro de flujo CyAn™ ADP (Beckman Coulter, USA).

6.9.6.5 Evaluación del potencial de membrana mitocondrial

Las mitocondrias son una de las organelas más importantes involucradas en la regulación de la apoptosis. El análisis del potencial de membrana mitocondrial fue evaluado utilizando la sonda fluorescente JC1. Las células fueron crecidas en placas de 12 pocillos (1,5x10⁵ células/pocillo) durante 24 h, donde luego se incubaron las células con los complejos por 6 h. Luego de ese tratamiento las células fueron lavadas con PBS y cosechadas con TrypLE™ a 37 °C por 5 min. Posteriormente se agregó la sonda JC1 (5 µg/mL) durante 30 min a 37 °C, se lavaron las células y se adquirieron las muestras en el citómetro de flujo BD FACS Calibur™ y el software FlowJo 7.6.

6.9.7 Análisis de la expresión de galectina-1 (Gal 1) y galectina-3 (Gal 3)

6.9.7.1 Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR)

La extracción de ARN total fue realizada utilizando las columnas comerciales Rneasy Plus Mini kit (QIAGEN), siguiendo las especificaciones del fabricante. La calidad e integridad del ARN purificado se evaluó espectrofotométricamente midiendo la relación de absorbancia a 260nm/280nm. Posteriormente, el cDNA se sintetizó a partir de 500 ng de ARN total utilizando el kit comercial *Revertaid* (Termo Scientific) siguiendo las especificaciones del fabricante. Para esto se preincubó durante 5 min las muestras a 65 °C, para luego realizar la síntesis utilizando las siguientes condiciones: 42 °C, 60 min y 70 °C durante 5 min. La mezcla final se almacenó a -20 °C hasta su uso.

La PCR se realizó utilizando el reactivo DreamTaq green (Termo Scientific) con 20 µL de volumen final en un ciclador My Cycler (Biorad). Los *primers* utilizados fueron los siguientes:

Gal 1 F : 5'-GGTCTGGTCGCCAGCAACCTG-3'

Gal 1 R : 5'-GGCCACACATTTGATCTTG-3'

Gal 3 F : 5'-CGCTCCATGATGCGTTATCTG-3'

Gal 3 R : 5'-AGGCACCACTCCCCAGGC-3'

β-Actina F : 5'-GCCGCCAGCTCACCAT-3'

β-Actina R : 5'-GAGGCGTACAGGGATAGCAC-3'

Las condiciones utilizadas para la amplificación de Gal-1 y Gal-3 fueron las siguientes:

95 °C, 3 min, 2 ciclos; 95 °C 30 seg, 56 °C 30 seg, 72 °C 30 seg, 30 ciclos; 72 °C, 10 min. Para la amplificación del gen de referencia (β -Actina) las condiciones fueron las siguientes: 95 °C, 3 min, 2 ciclos; 95 °C 30 seg, 60 °C 30 seg, 72 °C 30 seg, 35 ciclos; 72 °C, 10 min

Las bandas fueron semi-cuantificadas utilizando el software ImageJ.

6.9.7.2 Western Blot

Las muestras se prepararon tomando una cantidad fija de proteínas (20 μ g), las cuales se llevaron a un mismo volumen final y se les agregó un volumen equivalente de buffer de siembra 2X (Laemmli Sample Buffer; Bio-Rad). Luego se desnaturalizaron las proteínas por incubación a 100°C por 5 min.

Para la electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE), se prepararon geles de poliacrilamida al 12%-15% de 1,5 mm de espesor. Luego de sembrar las muestras, la corrida electroforética fue realizada en una cuba de electroforesis de 1,5 mm de espesor (Mini Protean II, Bio-Rad) a 110 V constante, en buffer de electroforesis (25 mM Tris pH 8,3 192 mM glicina; 0,1% SDS) durante 1 h aproximadamente.

Los siguientes pasos llevados a cabo son descriptos a continuación:

-Preparación de geles: El gel de poliacrilamida al 15% (gel de resolución) se preparó agregando 2,3 mL de agua destilada, 2,5 mL de buffer (1,5M Tris-HCl pH: 8,6), 5 mL de acrilamida 30%/ bisacrilamida 1%, 50 μ l de SDS 10%, 100 μ l de persulfato de amonio y 10 μ l de TEMED,

-Transferencia a membranas de PVDF: Las proteínas separadas por electroforesis se transfirieron utilizando un equipo Mini transblot (Bio-Rad) a una membrana PVDF (GE Healthcare). Este dispositivo permite transferir las proteínas cargadas negativamente, mediante una corriente eléctrica que moviliza a las proteínas desde el gel hacia la membrana. Para ello se utilizó buffer de transferencia

(25 mM Tris pH 8,3; 192 mM glicina; 0,1%SDS, 20% metanol) y la misma se realizó a 200 mA constante durante 60 min. Luego, las membranas se incubaron con buffer de bloqueo (5% leche descremada en PBS) durante 2 h a temperatura ambiente.

-Ensayo inmunoquímico: Las membranas, previamente bloqueadas, se lavaron con Buffer PBS-T (137 mM NaCl, 2,7mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1,8mM KH₂PO₄, 0,1%Tween-20) y posteriormente se incubaron a temperatura ambiente con el anticuerpo primario diluido 5% leche descremada en PBS durante 1 h. Luego las membranas fueron lavadas con Buffer PBS-T y se incubaron durante 1 h con el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa. El revelado se realizó con el Kit de quimioluminiscencia ECL (Perkin Elmer).

Los anticuerpos utilizados fueron los siguientes: anti Gal 1 (R&D systems), anti Gal 3 (Santa Cruz), anti-tubulina (Sigma).

6.9.8 Análisis de la secreción de Gal 1 y Gal 3

La concentración de Gal 1 y Gal 3 soluble fue determinada en los sobrenadantes de cultivo por la técnica de ELISA. Luego de coleccionar los sobrenadantes, se adicionaron 9 volúmenes de metanol frío y se incubaron durante 16 h a -20°C para precipitar las proteínas correspondientes. Para el ensayo se utilizaron microplacas de 96 pocillos de alta afinidad que fueron incubadas por 2 h a 37 °C con 100 μ L de las muestras y de diferentes concentraciones de galectina recombinante como estándar. Luego, de dos lavados con

PBS 0,01% Tween-20 se agregó solución bloqueadora (4% BSA) durante 2 h a temperatura ambiente. Posteriormente, se realizaron tres lavados con PBS 0,01% Tween-20 y se adicionaron 100 μ L de una dilución 1/1000 de anticuerpo (anti-Gal 1 policlonal de conejo, Santa Cruz, anti-Gal 3 monoclonal de ratón, Santa Cruz) por 1 h a temperatura ambiente. Luego de tres lavados correspondientes, se agregaron 100 μ L de una dilución 1/4000 de anticuerpo anti-conejo y anti-ratón (BIO-RAD) incubándose por 1 h a temperatura ambiente. Luego de lavar, 100 μ L de solución de TMB (0.1 mg/mL tetrametilbenzidina y 0,06% H₂O₂ en citrato-fosfato buffer, pH 5.0) fueron agregados a cada pocillo por 5 min, a los cuales se adicionaron 100 μ L de HCl 1M para detener la reacción. La densidad óptica fue medida a 450 nm en un espectrofotómetro multiplaca (spectra max340, Molecular Devices). La curva de calibración fue construida contemplando el rango de concentraciones que va desde 10 - 500 ng/mL.

6.9.9 Análisis de unión a azúcares de superficie usando lectinas comerciales

Para la determinación de azúcares expuestos en superficies se utilizaron las siguientes lectinas comerciales: MAA (*Mackia amurensis*), SBA (*Soybean*), SNA (*Sambucus Nigra*), PNA (*Arachis Hypogaea*), Ulex y concanavalina A.

La determinación se realizó empleando una técnica colorimétrica y otra fluororimétrica utilizando citometría de flujo. Para la primera se usaron lectinas acopladas a peroxidasa (HRP) y para el segundo caso se utilizaron lectinas acopladas a fluoresceína (FITC)

Para el ensayo colorimétrico se utilizaron placas de 96 pocillos en las cuales se sembraron 20000 células/pocillo. Luego de 24 h de crecimiento y de los tratamientos correspondientes, se efectuaron dos lavados con PBS y se incubó durante 1 h a temperatura ambiente con las lectinas correspondiente (10 μ g/mL en PBS). Posteriormente, se realizaron dos lavados y se reveló utilizando 100 μ L de TMB por 5 min y el posterior agregado de 100 μ L de HCl 1 M. Se utilizó como control positivo sialidasa comercial (*Clostridium perfringens* 50mU/mL)

Para el ensayo fluororimétrico las células fueron crecidas en placas de 12 pocillos (250000 células/pocillo) por 24 h. Luego de los tratamientos correspondientes con las diversas drogas, se lavaron y levantaron las células con *Cell Stripper* (Sigma), se realizaron 2 lavados con PBS y se fijaron con paraformaldehído al 4% por 10 minutos a temperatura ambiente. Luego de esto, se realizó un lavado y la incubación con la lectina correspondiente (10 μ gr/mL) por 1 h a temperatura ambiente. A continuación se realizaron 2 lavados más con PBS y se procedió a medir la fluorescencia utilizando un citómetro de flujo C6 Accuri BD. El software utilizado fue el CFlow sampler y para cada análisis se tomaron 10.000 eventos del *Gate* FSC vs SSC.

6.9.10 Determinación de la muerte celular inducida por Gal 1 y Gal 3 recombinante.

Para el ensayo se utilizaron las proteínas recombinantes dializadas por 16 h en PBS en presencia de 10 μ M de beta-mercaptoetanol. A continuación se cuantificó la proteína dializada midiendo su absorbancia a 280 nm y se procedió a adicionarla al medio de cultivo en las concentraciones correspondientes y realizar las incubaciones a 6 y 24 h. Para los ensayos de control de especificidad se realizó una pre-incubación de una hora a 37 °C de la galectina en presencia de lactosa 100 mM y sacarosa 100 mM (control) en medio de cultivo DMEM suplementado con 1 μ M de beta-mercaptoetanol. Posteriormente se adicionó el medio de cultivo con diversas concentraciones de galectina

correspondiente, incubándola por 4 h. Para los ensayos con el compuesto de vanadio se preincubaron las células con 100 μM del mismo por 3 h, luego se lavó la monocapa 2 veces con medio DMEM, para luego realizar las incubaciones correspondientes con la galectina recombinante en DMEM suplementado con 1 μM de beta-mercaptoetanol. Las células fueron cultivadas por 24 h en placas de 12 pocillos (2.5×10^5 células/pocillo) para luego ser levantadas con TryPLE™, centrifugadas y lavadas con PBS para posteriormente ser incubadas con anexina V (1 μg /mL) y yoduro de propidio (IP; 2,5 μg / mL) en buffer de unión (10 mM HEPES / 140 mM NaCl / 2,5 mM CaCl₂, pH = 7,4). Las células fueron analizadas utilizando el citómetro de flujo C6 Accuri BD (Beckman Coulter, USA) y el software utilizado fue el CFlow sampler. Para cada análisis se tomaron 10.000 eventos del *Gate* FSC vs SSC.

6.9.11 Ensayo de inhibición de la vía NF- κ B utilizando la línea celular HT-29-NF κ B-hrGFP

Células HT-29-NF- κ B-hrGFP (Guimarães y col. 2010) fueron sembradas en placas de 96 pocillos ($5,0 \times 10^4$ células/ pocillo) en medio RPMI con 10% de SFB. Luego de 24 h de crecimiento, se colocaron 25 y 50 μM de los complejos de vanadio durante 2 h previas a la estimulación con 3 ng/mL de TNF- α . Las células fueron incubadas durante 18 h a 37 °C y finalmente levantadas con tripsina para su posterior análisis por citometría de flujo. Las células fueron analizadas utilizando el citómetro CyAn™ ADP (Beckman Coulter, USA) y el software Summit v4.3. Las emisiones de fluorescencia para la proteína verde fluorescente (GFP) y el yoduro de propidio (IP) fueron detectadas utilizando un filtro *band-pass* 530/40 y 613/20 respectivamente. Para cada análisis se tomaron 10.000 eventos del *Gate* FSC vs SSC, excluyendo los dobles. Solo las células vivas (excluyendo las IP (+)) fueron consideradas para el análisis.

6.10 Desarrollo de matrices poliméricas para la liberación controlada de fármacos

6.10.1 Síntesis de la dispersión de poliuretano

La matriz polimérica se sintetizó empleando los siguientes reactivos: di(4-isocianatociclohexil)metano, metacrilato de 2-hidroxietilo (HEMA), ácido dimetilolpropiónico (DMPA), persulfato de potasio (KPS), etilendiamina (EDA), dibutil dilaurato de estaño (DBTDL) y trietilamina (TEA), que fueron utilizados como se recibieron. El poli(propilenglicol) fue secado y desgasado a 80 °C y 1-2 mm de Hg antes de ser empleado. La síntesis fue llevada a cabo por el grupo de Dr Javier I. Amalvy, del Instituto de Investigaciones Fisicoquímicas Teóricas y Aplicadas (INIFTA) siguiendo lo especificado por Pardini y Amalvy 2008.

6.10.2 Incorporación del principio activo y síntesis de las películas

El complejo se incorporó en la dispersión polimérica, de forma de obtener películas con el compuesto de vanadio y crisina incorporado. Las películas se prepararon por deposición (“*casting*”) de la dispersión polimérica acuosa sobre un molde. Luego se trataron térmicamente a 60 °C por 48 h para permitir una coalescencia completa y se cortaron círculos de 8 mm de diámetro.

6.10.3 Liberación de VOcris

La liberación de VOcris se realizó en medio de cultivo DMEM (sin rojo fenol) a 37 °C y la concentración de VOcris liberada se determinó por espectroscopia UV-visible a 234 nm y tomando muestras a diferentes tiempos (0-24 h).

6.11 Metodología específica utilizada en animales (Ensayos *in vivo*)

6.11.1 Mantenimiento de los animales

Los animales utilizados en este trabajo fueron ratones tanto hembras como machos de la cepa **N:NIH(S)-FoxI^{nu}** de aproximadamente un mes de edad. Estos fueron provistos y criados en el bioterio de la Facultad de Ciencias Veterinarias, FCV, UNLP, el cual se halla especialmente equipado para garantizar las condiciones de asepsia necesarias, en ambiente climatizado y con ciclos de luz (6 a.m. a 6 p.m.) y oscuridad (6 p.m. a 6 a.m.) controlados en forma automática. Los animales fueron alimentados “ad libitum” con una dieta standard de laboratorio para roedores esterilizada con radiación gamma, y se les permitió libre acceso al consumo de agua acidulada (pH= 3) esterilizada en autoclave.

6.11.2 Bioética

Los procedimientos experimentales con animales utilizados en el presente trabajo, siguen las normativas internacionales y están basados en la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio “Guide for the Care and Use of Laboratory Animals” de la National Research Council (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. National Research Council, USA 2002. Laboratory Animals. A.A Tuffery.1995. London: John Wiley). Además, fueron previamente supervisados por el Comité Institucional de Cuidados y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UNLP (Nro de protocolo E36-3-13).

6.11.3 Desarrollo y establecimiento de un modelo animal murino **N:NIH(S) Fox1^{nu} xenotransplantado con la línea celular de osteosarcoma humano MG-63.**

La condición atímica de los ratones nude conduce a una deficiencia de la inmunidad adaptativa lo cual permite la aceptación de xenotransplantes (Rygaard 1969, Manning y col. 1973) transformando a estos animales en excelentes huéspedes para el desarrollo de tumores provenientes de líneas celulares tumorales humanas.

Para los ensayos correspondientes a la generación del modelo animal xenotransplantado se utilizaron ratones machos y hembras (n= 5) inoculados por vía subcutánea con diferentes cantidades de células tumorales derivadas de la línea de osteosarcoma humano MG-63 (2x10⁵, 4x10⁵, 1x10⁶ y 2x10⁶ células/animal) para testear cual es la mejor relación de cantidad de células/crecimiento y desarrollo del tumor. Una vez establecido el tumor se procedió a realizar repiques sucesivos del mismo en animales **N:NIH(S)-FoxI^{nu}** para evaluar su estabilidad. Para esto se sacrificó un animal con el tumor crecido y se extrajo el tumor para luego ser diseccionado en pequeñas porciones de igual tamaño (Fig 104). Luego se realizó el repique sobre animales sanos que fueron previamente anestesiados con una mezcla de ketamina-xilacina (80:20). Al finalizar el protocolo de experimentación los animales fueron sacrificados respetando las normas de ética correspondientes por lo cual el método de eutanasia elegido fue la inhalación de una mezcla 80:20%CO₂/O₂.

Luego de ser sacrificados, estos fueron inspeccionados de forma general y diversas porciones del tumor extraído fueron analizadas desde el punto de vista histopatológico para confirmar la etiología del tumor xenotransplantado.



Figura 104 Mantenimiento del tumor. Animales con tumor primario (inoculo de células MG-63 en cultivo) se sacrificaron y se obtuvieron los tumores para mantenerlos por repiques sucesivos. El tejido tumoral obtenido se lavó con medio de cultivo DMEM y se diseccionó con la ayuda de una tijera en partes iguales. Luego se inocularon los animales nude que fueron previamente anestesiados con ketamina-xilacina (80:20). Todos los procedimientos se realizaron en estrictas condiciones de esterilidad.

6.11.4 Medición de las dimensiones tumorales

Cuando los tumores implantados se tornaron palpables fueron medidos con un calibre y el volumen tumoral fue calculado usando la fórmula de un elipsoide: $V = a^2 \cdot b / 2$ donde a y b son el ancho y el largo del tumor respectivamente, ambos expresados en milímetros. Para el caso del desarrollo y el establecimiento del tumor en el modelo murino *N:NIH(S) FoxItm* los tumores fueron medidos diariamente. Para el caso de los ensayos de actividad antitumoral *in vivo* los mismos fueron medidos cada 3 días. El tamaño de los tumores fue expresado ya sea como volumen total o como volumen relativo (Fig 105). Este último fue calculado por la fórmula V_i/V_0 , donde V_i es el volumen tumoral medido en el tiempo i y V_0 es el volumen tumoral medido al inicio de cada experimento (Houchens y col. 1978).

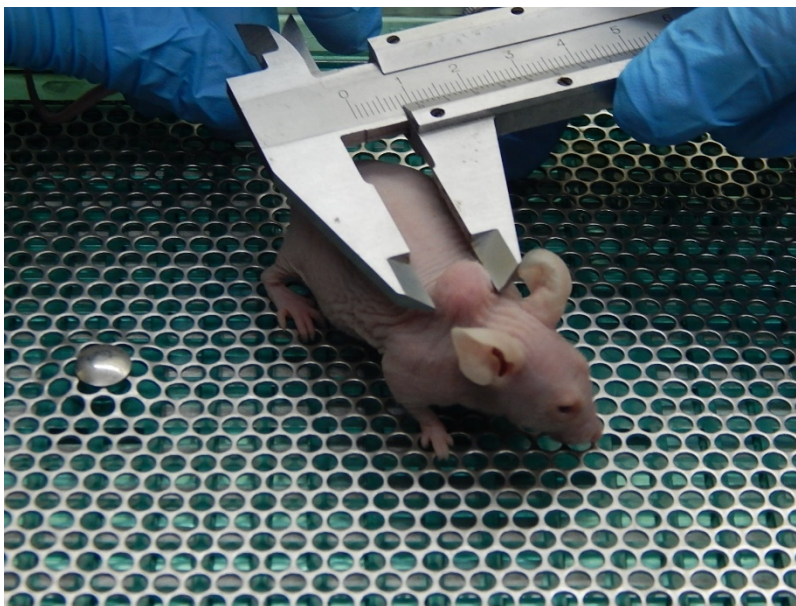


Figura 105 Medición de las dimensiones tumorales. Se midió el ancho (a) y el largo (b) del tumor con calibre y se aproximó su volumen según la fórmula del elipsoide: $V = a^2 \cdot b / 2$.

6.11.5 Evaluación de los efectos antitumorales *in vivo* por metalodrogas en el modelo murino N:NIH(S) Fox1^{nu} xenotransplantado con la línea celular de osteosarcoma humano MG-63.

La capacidad antitumoral de la droga en cuestión se evaluó utilizando hembras (n=5 para cada grupo) inoculadas con 2×10^6 células. Luego del crecimiento del tumor, se dosificaron cada 24 h durante 11 días hembras control (200 μ L DMSO al 5%) y tratadas con la droga (200 μ L de una solución 1000 y 5000 μ M del complejo $[\text{VO}(\text{crisina})_2\text{EtOH}]_2$ inyectadas por vía intraperitoneal) disueltos en 5% de DMSO). Se realizaron medidas de la forma, tamaño del tumor con un calibre y del peso de los animales así como de los tumores al final de la operación. Luego se calcularon los volúmenes correspondientes como fue especificado en el punto anterior en la cual ancho y largo se refieren a las magnitudes del tumor. Posteriormente se realizó el gráfico correspondiente (volumen del tumor vs días de tratamiento) y se compararon estadísticamente utilizando el método de Student.

6.11.6 Evaluación de los efectos tóxicos de las metalodrogas.

La toxicidad de las metalodrogas testeadas fue corroborada en el animal midiendo el peso corporal (PC) final, el peso del tumor (PT) y el peso corporal corregido por el peso que le aporta el tumor al animal (PC-PT). Para esto al finalizar la experiencia se procedió a pesar los animales y luego de la eutanasia a extraerle el tumor para posteriormente ser pesado.

6.12 Técnicas auxiliares

6.12.1 Determinación de proteínas.

La determinación de la concentración de proteínas se realizó utilizando el método de Bradford y el de BCA (ácido bicinónico). Para la determinación por el primer método se utilizó una mezcla de 25 µL de muestra con 2 mL de reactivo de Bradford, luego de 5 min de incubación se registró la absorbancia a 595 nm.

Para el segundo método se procedió de la siguiente manera: La solución BCA se preparó en base a dos soluciones (solución A y B en la relación 49:1). Luego, en una placa de 96 pocillos, se colocaron 200 µL de solución de BCA y 25 µL de extracto proteico, diluido en agua destilada.

Posteriormente, la microplaca se incubó durante 30 min a 37° C, para luego registrar la absorbancia a 550 nm en un espectrofotómetro de placa (Labystems Multiskan). Para cuantificar la absorbancia se realizó el mismo procedimiento con una curva estándar (0,5-100 µg/mL) de albúmina sérica bovina (BSA).

6.13 Análisis estadístico

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 ± error estándar de la media (SEM). Todos los valores con $p < 0,01$ se consideraron estadísticamente significativo.

7. BIBLIOGRAFIA

**“El que abandona no tiene premio”
Sorpresa de Shangai, Lobo suelto
cordero atado, 1993. Patricio rey y sus
redonditos de ricota.**

- Ahmad S. 2010. Platinum-DNA interactions and subsequent cellular processes controlling sensitivity to anticancer platinum complexes. *Chem Biodivers.* 7: 543-66.
- Ajeawung N.F., Faure R., Jones C., Kamnasaran D. 2013. Preclinical evaluation of dipotassium bisperoxo (picolinato) oxovanadate V for the treatment of pediatric low-grade gliomas. *Future Oncol.* 9: 1215-1229.
- Alberico E., Micera G., 1994. Phosphate complexation of oxovanadium(IV). Evidence of bidentate chelation of orthophosphate. *Inorg. Chim. Acta* 215: 225-227.
- Allen R.G., Tresini M. 2000. Oxidative stress and gene regulation. *Free Radic. Biol. Med.* 28: 463-499.
- Álvarez L., Griirane A., Moyano R., Álvarez E., Pastor A., Galindo A. 2010. Comparison of the coordination capabilities of thiodiacetate and oxydiacetate ligands through the X-ray characterization and DFT studies of [VO(tda)(phen)]·4H₂O and [(VOoda)(phen)]·1.5H₂O. *Polyhedron* 29: 3028-3035.
- Andrezálová L., Gbelcová H., Duračková Z. 2013. DNA damage induction and antiproliferative activity of vanadium(V) oxido monoperoxido complex containing two bidentate heteroligands. *J Trace Elem Med Biol.* 27 : 21-6.
- Anke M., Groppe B., Krause U., 1991. In *Trace Elements in Man and Animals*, Momciliovic B Ed. IMI, Zagreb, Vol 7, 11.9 - 11.10.
- Aris S.M., Farrell N.P. 2009. Towards Antitumor Active trans-Platinum Compounds. *Eur. J. Inorg. Chem.* 10: 1293.
- Arrambide G., Barrio D.A., Etcheverry S.B., Gambino D., Baran E.J. 2010. Spectroscopic behavior and biological activity of K₂[VO(O₂)NTA]·2H₂O. *Biol Trace Elem Res.* 2010 Aug;136(2):241-8.
- Aubin J.E. 1998. Bone stem cells. *J. Cell. Biochem. Suppl.* 30: 73-82.
- Aubrecht J., Narla R.K., Ghosh P., Stanek J., Uckun F.M., 1999. Molecular genotoxicity profiles of apoptosis-inducing vanadocene complexes. *Toxicol Appl Pharmacol.* 154:228-235.
- Babich H., Borenfreund E. 1992. Neutral Red Assay for Toxicology in vitro. En: Ronald R. Watson (editor). *In vitro Methods of Toxicology. Handbooks in Pharmacology and Toxicology.* CRC Press, Boca Raton, USA.
- Baes J., Charles F., Mesmer R.E., 1976. *The hydrolysis of Cations.* Eds.; John Wiley & Sons: New York.
- Baggio R., Garland M.T., Pereg M. 2003. A new polymeric phase of zinc(II) oxydiacetate. *Acta Crystallographica Section C.* 59: 30.
- Baran E.J., 2000. Oxovanadium(IV) and oxovanadium(V) complexes relevant to biological systems. *Journal of Inorganic Biochemistry.* 80: 1-10.
- Barrio D.A., Williams P.A., Cortizo A.M. and Etcheverry S.B., 2003. Synthesis of a new vanadyl(IV) complex with trehalose (TreVO): Insulin-mimetic activities in osteoblast-like cells in culture, *Journal of Biological Inorganic Chemistry* 8: 459-468.
- Barrio D.A., Etcheverry S.B., 2006. Vanadium and bone development: putative signaling pathways. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 84: 677-686.
- Barrow H., Rhodes J.M., Yu L.G 2011. The role of galectins in colorectal cancer progression. *Int J Cancer* 129: 1-8.

- Baruah H., Barry C.G., Bierbach U. 2004. Platinum-intercalator conjugates: from DNA-targeted cisplatin derivatives to adenine binding complexes as potential modulators of gene regulation. *Curr Top Med Chem.* 2004;4(15):1537-49.
- Bisceglie F., Pinelli S., Alinovi R., Tarasconi P., Buschini A., Mussi F., Mutti A., Pelosi G. 2012. Copper(II) thiosemicarbazone molecular modifications modulate apoptotic and oxidative effects on U937 cell line. *J. Inorg. Biochem.* 116: 195–203.
- Biggerstaff J.P, Seth N, Amirkhosravi A, Amaya M, et al., 1999. Soluble fibrin augments platelet tumor cell adherence in vitro and in vivo and enhances experimental metastasis. *Clin Exp Metastasis* 17:723–730.
- Bishayee A, Karmakar R, Mandal A, Kundu SN, Chatterjee M. 1997. Vanadium mediated chemoprevention against chemical hepatocarcinogenesis in rats: haematological and histological characteristics. *Eur J Cancer Prev.* 6:58–70.
- Bishayee A., Chatterjee M., 1995. Inhibitory effect of vanadium on rat liver carcinogenesis initiated with diethyl nitrosamine and promoted by phenobarbital. *Br. J. Cancer.* 71: 1214–1220.
- Bishayee A., Oinam S., Basu M., Chatterjee, M., 2000. Vanadium chemoprevention of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced rat mammary carcinogenesis: probable involvement of representative hepatic phase I and II xenobiotic metabolizing enzymes. *Breast Cancer Res. Treat.* 63: 133–145.
- Bishayee A., Waghray A., Mehoor A., Patel A., Chatterjee, M., 2010. Vanadium in the detection, prevention and treatment of cancer: The in vivo evidence *Cancer Letters* 294: 1–12.
- Blaser C., Kaufmann M., Muller C., Zimmermann C., Wells V., Mallucci L., Pircher H. 1998. Beta-galactoside-binding protein secreted by activated T cells inhibits antigen-induced proliferation of T cells. *Eur J Immunol.* 28: 2311-2319.
- Boccarelli A., Intini F.P., Sasanelli R., Sivo M.F., Coluccia M., Natile G. 2006. Synthesis and in vitro antitumor activity of platinum acetonimine complexes. *J. Med. Chem.* 49: 829-37.
- Boonstra J., Post J.A., 2004. Molecular events associated with reactive oxygen species and cell cycle progression in mammalian cells. *Gene* 337:1 –13.
- Borenfreund E., Puerner J.A. 1984. A simple quantitative procedure using monolayer culture for toxicity assays. *J Tissue Cult. Methods* 9: 7–9-
- Borges B.E., Teixeira V.R., Appel M.H., Steclan C.A., Rigo F., Filipak Neto F., da Costa Ferreira A.M., Chammass R., Zanata S.M., Nakao L.S. 2013. De novo galectin-3 expression influences the response of melanoma cells to isatin-Schiff base copper (II) complex-induced oxidative stimulus. *Chem Biol Interact.* 2013 Oct 25;206(1):37-46.
- Bors W., Heller W., Michel C., Saran M., 1990. Flavonoids as antioxidants: determination of radical-scavenging efficiencies. *Methods Enzymol* 186:334–355.
- Boulikas T., Stathopoulos G.P., Volakakis N., Vougiouka M. 2005. Systemic lipoplatin infusion results in preferential tumor uptake in human studies. *Anticancer Res.* 25: 3031–3039.
- Bours V., Bentires-Alj M., Hellin A-C., et al., 2000. Nuclear factor-kB, cancer and apoptosis. *Biochem Pharmacol.* 60:1085–1090.

- Bradford M. 1976. Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248–254.
- Branca M., Micera, G., Dessi, A., Sanna D., 1992. Oxovanadium(IV) complex formation by simple sugars in aqueous solution. *J. Inorg. Biochem.* 45: 169-177.
- Brichard S.M., Henquin J.C. 1995. The role of vanadium in the management of diabetes. *Trends Pharmacol Sci.* 16: 265–270.
- Brown G.C., Borutaite V., 2001. Nitric oxide, mitochondria, and cell death. *IUBMB Life* 52:189–195.
- Buglyo P., Kiss E., Fábian I., et al., 2000. Speciation and NMR relaxation studies of VO(IV) complexes with several O-donor containing ligands: oxalate, malonate, maltolate and kojate. *Inorg. Chim. Acta* 306: 174-183.
- Burkle A., 2000. Poly(ADP-ribosyl)ation, genomic instability and longevity. *Ann NY Acad Sc.* 908:126–132.
- Butenko N., Tomaz A.I., Nouri O., Escribano E., Moreno V., Gama S., Ribeiro V., Telo J.P., Costa Pesssoa J., Cavaco I. 2009. DNA cleavage activity of V IV O(acac)₂ and derivatives. *J. Inorg. Biochem.* 103: 622-632.
- Butler A., Walker J.V., Marine haloperoxidases. 1998. *Chem. Rev.* 93: 1937-1944.
- Cabello C.I., Egusquiza M.G., Botto I.L., Minelli G. 2004. Heteropolyoxotungstates containing a wide catalytic target: Reducibility and Thermal stability, *Mater. Chem. Phys.* 87: 264.
- Caicedo M., Jacobs J.J, Reddy A., Hallab N.J., 2008. Analysis of metal ion-induced DNA damage, apoptosis, and necrosis in human (Jurkat) T-cells demonstrates Ni²⁺ and V³⁺ are more toxic than other metals: Al³⁺, Be²⁺, Co²⁺, Cr³⁺, Cu²⁺, Fe³⁺, Mo⁵⁺, Nb⁵⁺, Zr²⁺. *J Biomed Mater Res A* 86:905-913.
- Calvert A.H., Harrap K.R., Wiltshaw E., Smith I.E. 1984. *Dev. Oncol.* 17: 240–252.
- Capella M.A.M., Capella L.S., Valente R.C., Gefé M., Lopes. A.G., 2007. Vanadate-induced cell death is dissociated from H₂O₂ generation. *Cell Biol Toxicol* 23:413–420.
- Cárdenas M., Marder M., Blank V.C., Roguin L.P. 2006. Antitumor activity of some natural flavonoids and synthetic derivatives on various human and murine cancer cell lines. *Bioorg Med Chem* 14: 2966-2971
- Carlini M.J., Roitman P., Nuñez M., Pallotta M.G., Boggio G., Smith D., Salatino M., Joffé E.D., Rabinovich G.A., Puricelli L.I. 2014. Clinical relevance of galectin-1 expression in non-small cell lung cancer patients. *Lung Cancer.* 84: 73-78.
- Cerliani J.P., Stowell S.R., Mascanfroni I.D., Arthur C.M., Cummings R.D., Rabinovich, G.A. 2011. Expanding the Universe of Cytokines and Pattern Recognition Receptors: Galectins and Glycans in Innate Immunity. *J Clin Immunol.* 31:10-21.
- Chakraborty T., Chatterjee A., Saralaya M.G., Dhachinamoorthi D., Chatterjee M. 2006. Vanadium inhibits the development of 2-acetylaminofluorene-induced premalignant phenotype in a two stage chemical rat hepatocarcinogenesis model, *Life Sci.* 78: 2839–2851.
- Chak C.W., Lee K.M., Leung K.S., Fung K.P. 1995. No change in bone - specific alkaline phosphatase activities in cultured rat osteoblastic cells under L - ascorbate

and B – glicerophosphate - induced mineralization. *Cell Biol Internat.* 19: 979 - 985

- Chang Y.Y., Chiang M.C., Kuo T.C., Chi L.L., Kao Y.H., Huang R.N. 2011. The down-regulation of galectin-1 expression is a specific biomarker of arsenic toxicity. *Toxicol Lett.* 205: 38-46.
- Chasteen N.D., 1983. The Biochemistry of Vanadium. *Struct. Bond* 53: 103 –136.
- Chasteen N.D., Grady, J.K., Holloway C.E., 1986. Characterization of the binding, kinetics, and redox stability of vanadium(IV) and vanadium(V) protein complexes in serum. *Inorg. Chem.* 25:2754-2760.
- Chasteen ND., 1990. *Vanadium in Biological Systems: physiology and biochemistry.* Ed.; Kluwer Academic Publishers: Dordrecht, The Netherlands.
- Chen F., Demers L.M., Vallyathan V., et al., 1999. Vanadate induction of NF- κ B involves I κ B kinase β and SARK/ERK kinase in macrophages. *J Biol Chem.* 274: 20307–20312.
- Chen F., Vallyathan V., Castranova V., Shi X., 2001. Cell apoptosis induced by carcinogenic metals. *Mol Cell Biochem.* 222:183-188.
- Chien P.S., Mak O.T., Huang H.J., 2006. Induction of COX-2 protein expression by vanadate in A549 human lung carcinoma cell line through EGF receptor and p38 MAPK-mediated pathway. *Biochem Biophys Res Commun.* 339:562-528.
- Chin L.S, Murray S.F., Harter D.H., Doherty P.F., Singh S.K., 1999. Sodium vanadate inhibits apoptosis in malignant glioma cells: a role for Akt/PKB. *J. Biomed. Sci.* 6: 213-218.
- Choy H., Park C., Yao M. 2008. Current status and future prospects for satraplatin, an oral platinum analogue. *Clin. Cancer Res.* 14: 1633–1638.
- Chung A.W., Sieling P.A., Schenk M., Teles R.M., Krutzik S.R., Hsu D.K., Liu F.T., Sarno E.N., Rea T.H., Stenger S., Modlin R.L., Lee D.J. 2013. Galectin-3 regulates the innate immune response of human monocytes. *J Infect Dis.* 207: 947-56.
- Clarke M.J., Zhu F., Frasca D.R. 1999. Non-platinum chemotherapeutic metallopharmaceuticals. *Chem Rev.* 99: 2511-2534.
- Clarkson P.M., Rawson E.S., 1999. Nutritional supplements to increase muscle mass. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 39: 317–328.
- Cleare M.J., Hydes P.C., 1980. en "Metal Ions in biological Systems" (H. Sigel, Ed.) Vol. 11, 1-62, M. Dekker. New York
- Collins A.R., Dobson V.L., Dusinka M., Kennedy G., Stetina R. 1997. The comet assay: what can it really tell us? *Mut Res.* 375: 183-193
- Cooke M.S., Evans M.D., Dizdaroglu M., Lunec J., 2003. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *FASEB J.* 17: 1195–1214.
- Cooper, D.N. 2002. Galectinomics: finding themes in complexity. *Biochim Biophys Acta* 1572: 209-231.
- Cortizo A.M., Etcheverry S.B., 1995. Vanadium derivatives act as growth factor-mimetic compounds upon differentiation and proliferation of osteoblast-like UMR106 cells. *Mol. Cell. Biochem.* 145: 97–102.
- Cortizo A.M., Molinuevo M.S., Barrio D.A., Bruzzone L., 2006. Osteogenic activity of vanadyl(IV)-ascorbate complex: evaluation of its mechanism of action. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 38: 1171-80.
- Costa Pessoa J., Etcheverry S.B., Gambino D. (2014) Vanadium compounds in medicine. *Cord Chem Rev.* En prensa.

- Costas M., Mehn M.P., Jensen M.P., Que L Jr. 2004. Dioxygen activation at mononuclear nonheme iron active sites: enzymes, models, and intermediates. *Chem Rev.* 104 (2004) 939
- Crans D.C. In: *Vanadium Compounds, Chemistry, Biochemistry and Therapeutic Applications*, ed. A.S. Tracey and D.C. Crans, American Chemical Society, Washington, USA, 1998, ch. 6 p. 82-103 .
- Crans D.C., Harnung S.E., Larsen E., Shin P.K., Theisen L.A., Trabjerg I., 1991. NMR, CD and MCD studies of vanadate-nucleoside complexes. *Acta Chem Scand.*45:456-462.
- Crans D.C y Tracey A.S.,1998. The chemistry of vanadium in aqueous and non-aqueous solution. In *Vanadium Compounds: chemistry, biochemistry and therapeutic applications*. Edited by AS Tracey y DC Crans. 1: 2-29.
- Crans D.C., Smee J.J., Gaidamauskas E., Yang L., 2004. The Chemistry and Biochemistry of Vanadium and the Biological Activities Exerted by Vanadium Compounds. *Chem. Rev.*104: 849-902.
- Crans D.C., 2005. Fifteen years of dancing with vanadium. *Pure Appl. Chem.* 77: 1497–1527.
- Croci D.O., Salatino M., Rubinstein N., Cerliani J.P., Cavallin L.E., Leung H.J., Ouyang J., Ilarregui J.M., Toscano M.A., Domaica C.I., Croci M.C., Shipp M.A., Mesri E.A., Albin A., Rabinovich G.A. 2012. Disrupting galectin-1 interactions with N-glycans suppresses hypoxia-driven angiogenesis and tumorigenesis in Kaposi's sarcoma. *J. Exp. Med.* 209: 1985-2000.
- Cruywagen J.J., Heyns J.B., Westra A.N., 1996. Protonation Equilibria of Mononuclear Vanadate: Thermodynamic Evidence for the Expansion of the Coordination Number in VO(2)(+). *Inorg Chem.*35:1556-1559.
- Cuesta S., Francés D., García G.B. 2011. ROS formation and antioxidant status in brain areas of rats exposed to sodium metavanadate. *Neurotoxicol Teratol.* 33:297-302.
- Dai S., Thompson K.H., McNeill J.H., 1994. One-year treatment of streptozotocin-induced diabetic rats with vanadyl sulphate. *Pharmacol Toxicol* 74(2):101-109.
- Dalla Via L, García-Argáez AN, Adami A, Grancara S, Martinis P, Toninello A, Belli Dell'Amico D, Labella L, Samaritani S. 2013. Synthesis, antiproliferative and mitochondrial impairment activities of bis-alkyl-amino transplatinumcomplexes. *Bioorg Med Chem.* 21: 6965-72.
- Danguy A., Camby I., Kiss R. 2002. Galectins and cancer. *Biochim Biophys Acta.* 1572: 285-293.
- Darwish H.A., Arab H.H., Abdelsalam R.M. 2014. Chrysin alleviates testicular dysfunction in adjuvant arthritic rats via suppression of inflammation and apoptosis: Comparison with celecoxib. *Toxicol Appl Pharmacol.* 279:129-40.
- Darzynkiewicz Z., Traganos F., Staiano-Coico L., Kapuscinski J., Melamed M.R., 1982. Interaction of rhodamine 123 with living cells studied by flow cytometry. *Cancer Res* 42:799-806.
- D'Cruz O.J., Uckun F.M., 2002. Metvan: a novel oxovanadium(IV) complex with broad spectrum anticancer activity. *Expert Opin Investig Drugs* 11:1829-1836.
- Del Rio D., Galindo A., Tejedo J., Bedoya F.J., Ienco A., Mealli C. 2000. Synthesis, antiapoptotic biological activity and structure of an oxo-vanadium(IV) complex with an OOO ligand donor set. *Inorg Chem Comm.* 3: 32–34.

- Dharwan S., Singh S., Aggarwal B.B., 1997. Induction of endothelial cell surface adhesion molecules by tumor necrosis factor is blocked by protein tyrosine phosphatase inhibitors: role of nuclear transcription factor NF- κ B. *Eur Immunol* 27: 2172–2179.
- Di Virgilio A.L., Iwami K., Wätjen W., Kahl R., Degen G.H. 2004. Genotoxicity of the isoflavones genistein, daidzein and equol in V79 cells. *Toxicology Letters*. 151: 151-162
- Di Virgilio A.L., Rivadeneira J., Muglia C.I., Reigosa M.A., Butenko N., Cavaco I., Etcheverry S.B. 2011. Cyto- and genotoxicity of a vanadyl(IV) complex with oxodiacetate in human colon adenocarcinoma (Caco-2) cells: potential use in cancer therapy. *Biometals*. 24: 1153-68.
- Dianat S., Bordbar A.K., Tangestaninejad S., Yadollahi B., Zarkesh-Esfahani S.H., Habibi P., 2013. ctDNA binding affinity and in vitro antitumor activity of three Keggin type polyoxotungstates. *J. Photochem. Photobiol. B*. 124: 27-33.
- Dicken D.S., Kozielski R., Leavey P.J., Timmons C., Cripe T.P. 2003. Cyclooxygenase-2 expression does not correlate with outcome in osteosarcoma or rhabdomyosarcoma. *J. Pediatr Hematol Oncol*. 25: 282-285.
- Ding M, Li J.J, Leonard S.S, Ye J.P., Shi X., Colburn N.H., Castranova V., Vallyathan V. 1999. Vanadate-induced activation of activator protein-1. Role of reactive oxygen species. *Carcinogenesis*: 20:663–668.
- Ding W.Q., Liu B., Vaught J.L., Yamauchi H., Lind S.E. 2005. Anticancer activity of the antibiotic clioquinol. *Cancer Res*. 65: 3389-95.
- Dizdaroglu M., Jaruga P., Birincioglu M., Rodriguez H., 2002. Free radical-induced damage to DNA: mechanisms and measurement. *Free Rad. Biol. Med*. 32:1102–1115.
- Djordjevic C., 1995. Antitumor Activity of Vanadium Compounds. *En Metal Ions in Biological Systems. Vanadium and its role in life*, pp 595-615. Editores: Sigel H and Sigel A. New York. Marcel Dekker, INC.
- Dooley T.P., Stamp-Cole M., Ouding R. 1993. Evaluation of a Nude Mouse Tumor Model Using β -Galactosidase expression Melanoma Cells. *Lab Anim Sci* 43: 48-57.
- Droupe E.B. 1985. The Use of Platinum Chemotherapy to Potentiate Radiotherapy Preclinical results encourage clinical trials *Platinum Metals Rev*. 29: 118-25.
- Droupe E.B. 1988. Platinum-radiation interactions. *NCI Monogr*. 6:315-9.
- Eady R.R., Richardson T.H., Miller R.W., Hawkins M., Lowe D.J., 1988. The vanadium nitrogenase of *Azotobacter chroococcum*. Purification and properties of the Fe protein. *Biochem J*. 256: 189-96.
- El-Bassossy H.M., Abo-Warda S.M., Fahmy A. 2014. Chrysin and Luteolin Alleviate Vascular Complications Associated with Insulin Resistance Mainly Through PPAR- γ Activation. *Am J Chin Med*. 29: 1-15.
- El-Naggar M.M., El-Waseef A.M., El-Halafawy K.M., El-Sayed I.H. 1998. Antitumor activities of vanadium(IV), manganese(IV), iron(III), cobalt(II) and copper(II) complexes of 2-methylaminopyridine. *Cancer Lett.* 133: 71-76.
- Escárcega R.O., Fuentes-Alexandro S., Garcia-Carrasco M., Gatica A., Zamora A. (2007). The transcription factor nuclear factor κ B and cáncer. *Clinical Oncology*. 19: 154-61.
- Espelt M.V., Croci D.O., Bacigalupo M.L, Carabias P., Manzi M., Elola M.T., Muñoz M.C., Dominici F.P., Wolfenstein-Todel C., Rabinovich G.A, Troncoso

- M.F. 2011. Novel roles of galectin-1 in hepatocellular carcinoma cell adhesion, polarization, and in vivo tumor growth. *Hepatology* 53: 2097-2106.
- Esterbauer H., Schaur R.J., Zollner H., 1991. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Rad. Biol. Med.* 11: 81–128.
 - Etcheverry S.B., Apella M.C., Baran E.J., 1984. A model study of the incorporation of vanadium in bone. *J Inorg Biochem* 20:269-274.
 - Etcheverry S.B., Barrio D.A., 2007. Vanadium and bone. En *Relevance of vanadium compounds in bone cells*. A.C.S. symposium series vol. 974, pp. 204-216. American Chemical Society, Washington, DC.
 - Etcheverry S.B., Ferrer E.G., Naso L., Rivadeneira J., Salinas V., Williams P.A. 2008. Antioxidant effects of the VO(IV) hesperidin complex and its role in cancer chemoprevention. *J Biol Inorg Chem.* 13: 435-47.
 - Etcheverry S.B., Williams P.A.M., Barrio D.A., Sállice V.C., Ferrer E.G., Cortizo A.M. 2000. Synthesis, caracterización and bioactivity of a new VO²⁺ / Aspirin complex. *J Inorg Chem.* 80: 169 - 171.
 - Etcheverry S.B., Williams P.A., Salice V.C., Barrio D.A., Ferrer E.G., Cortizo A.M. 2002. Biochemical properties and mechanism of action of a vanadyl(IV)-aspirin complex on bone cell lines in culture. *Biomaterials*.15: 37-49.
 - Evangelou A., Karkabounas S., Kalpouzou G., Malamas M., Liasko R., Stefanou D., Vlahos A.T., Kabanos T.A. 1997. Comparison of the therapeutic effects of two vanadium complexes administered at low dose on benzo[a]pyrene-induced malignant tumors in rats. *Cancer Lett.* 119: 221-5.
 - Evangelou A.M., 2002. Vanadium in cancer treatment. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 42: 249-265.
 - Farinelli S. E., Greene L. A., 1996. Cell cycle blockers mimosine, ciclopirox, and deferoxamine prevent the death of PC12 cells and postmitotic sympathetic neurons after removal of trophic support. *J Neurosci.* 16:1150-62
 - Faure, R., Vincent, M., Dufour, M., Shaver, A. and Posner, B. I. ,1995. Arrest of the G2/M transition of the cell cycle by protein tyrosine phosphatase inhibition: studies on a neuronal and a glial cell line. *J. Cell. Biochem.* 58: 389–401.
 - Faux N.G., Ritchie C. W., Gunn A., Rembach A., Tsatsanis A., Bedo J., Harrison J., Lannfelt L., Blennow K., Zetterberg H., Ingelsson M., Masters C. L, Tanzi R. E., Cummings J. L., Herd C.M., Bush A.I. 2010. PBT2 rapidly improves cognition in Alzheimer’s disease: Additional phase II analyses *J. Alzheimers Dis.*, 20: 509.
 - Fernández M., Varela J., Correia I., Birriel E., Castiglioni J., Moreno V., Costa Pessoa J., Cerecetto H., González M., Gambino D. 2013. A new series of heteroleptic oxidovanadium(IV) compounds with phenanthroline-derived co-ligands: selective *Trypanosoma cruzi* growth inhibitors. *Dalton Trans.* 42: 11900-11.
 - Guimarães F.S., Andrade L.F., Martins S.T., Abud A.P., Sene R.V., Wanderer C., Tiscornia I., Bollati-Fogolin M., Buchi D.F., Trindade E.S. 2010. In vitro and in vivo anticancer properties of a *Calcarea carbonica* derivative complex (M8) treatment in a murine melanoma model. *BMC Cancer.* 10: 113.
 - Fenech M. 2000. The in vitro micronucleus technique. *Mut. Res.* 455: 81-95.
 - Ferrer E.G., Salinas M.V., Correa M.J., Naso L., Barrio D.A., Etcheverry S.B., Lezama L., Rojo T., Williams P.A.M., 2006. Synthesis, characterization,

- antitumoral and osteogenic activities of quercetin vanadyl (IV). *J Biol Inorg Chem* 11: 791–801.
- Finke R.G., Droegge M.W., Domaille P.J. 1987. Trivacant Heteropolytungstate Derivatives. 3.' Rational Syntheses, Characterization, Two-Dimensional 183W NMR, and Properties of P₂W₁₈M₄(H₂O)₂₀ss₁₀- and P₄W₃₀M₄(H₂O)₂₀1.121" (M=Co,Cu,Zn) *Inorg. Chem.* 26: 3886.
 - Fisher M.B., Thompson S.J., Ribeiro V., Lechner M.C., Rettie A. 1998. P450-catalyzed in-chain desaturation of valproic acid: isoform selectivity and mechanism of formation of Delta 3-valproic acid generated by baculovirus-expressed CYP3A1. *Arch. Biochem. Biophys.* 356: 63-70.
 - Fogh J. 1975. Human tumor cells in vitro. New York: Plenum Press.
 - Fortuna-Costa A., Gomes A.M., Kozłowski E.O., Stelling M.P., Pavão M.S. 2014. Extracellular galectin-3 in tumor progression and metastasis. *Front Oncol.* 4:138
 - Fratz - Zelman N., Hörandner H., Luegmayr E., Varga F., Ellinger A., Erlee M.P.M., Klaushofer K. 1997. Effects of triiodothyronine on the morphology of cells and matrix, the localization of alkaline phosphatase, and the frequency of apoptosis in long - term cultures of MC3T3E1 cells. *Bone.* 20: 225-236.
 - Fu Y, Wang Q, Yang X-G., Yang X-D., Wang K., 2008. Vanadyl bisacetylacetonate induced G1/S cell cycle arrest via high-intensity ERK phosphorylation in HepG2 cells. *J Biol Inorg Chem* 13:1001–1009.
 - Funasaka T., Raz A., Nangia-Makker P. 2014. Galectin-3 in angiogenesis and metastasis. *Glycobiology.* 24: 886-91.
 - Galanski M. 2006. Recent developments in the field of anticancer platinum complexes. *Recent Pat Anticancer Drug Discov.* 1: 285-95.
 - Galanski M., Arion V.B., Jakupec M.A., Keppler B.K. 2003. Recent developments in the field of tumor-inhibiting metal complexes. *Curr.Pharm. Des.* 9: 2078–2089.
 - Galanski M., Jakupec M.A., Keppler B.K. 2005. Update of the preclinical situation of anticancer platinum complexes: novel design strategies and innovative analytical approaches. *Curr. Med. Chem.* 2005, 12: 2075–2094.
 - Gândara R.M., Soares S.S., Martins H., Gutiérrez-Merino C., Aureliano M., 2005. Vanadate oligomers: in vivo effects in hepatic vanadium accumulation and stress markers. *J Inorg Biochem.* :1238-1244.
 - Gao Y., Tu Y.B., Guo Y., Yang L.Y., Guo X.H., Xu L., Xu Z.R., Wu S.L. 2011. PpGalNacT2 participating in vanadium-induced HL-60 cell differentiation. *Mol Biol Rep* 38: 1483–1489
 - García G.B., 2006. *Acta Toxicol. Argent.* 14:32-36.
 - Garribba E., Lodyga-Chruscinska E., Sanna D., Micera G., 2001. Oxovanadium(IV) binding to ligands containing donor sites of biological relevance. *Inorg. Chim. Acta* 322: 87-98.
 - Gažák R., Svobodová A., Psotová J., Sedmera P., Pikřylová V., Walterová D., Křena V., 2004. Oxidised derivatives of silybin and their antiradical and antioxidant activity. *Bioorg. Med. Chem.* 12: 5677-5687.
 - Gęgotek A., Markowska A., Łuczaj W., Bielawska A, Bielawski K, Ambrożewicz E, Skrzydlewska E. 2013. Effects of dinuclear berenil-platinum(II) complexes on fibroblasts redox status. *Adv Med Sci.* 58: 282-91.

- Gharagozloo M., Khoshdel Z., Amirghofran Z. 2008. The effect of an iron (III) chelator, silybin, on the proliferation and cell cycle of Jurkat cells: A comparison with desferrioxamine. *Eur. J. Pharmacol.* 589: 1-7.
- Ghosh P., D’Cruz O.J., Narla R.K., Uckun F.M. 2000. Apoptosis-inducing vanadocene compounds against human testicular cancer. *Clin Cancer Res.* 6: 1536-45.
- Ghosh-Laskar S., Kalyani N., Gupta T., Budrukkar A., Murthy V., Sengar M., Chaukar D., Pai P., Chaturvedi P., D’cruz A., Agarwal J.P. 2014. Conventional radiotherapy vs concurrent chemoradiotherapy vs accelerated radiotherapy in loco-regionally advanced carcinoma of head and neck: Results of a prospective randomised trial. *Head Neck.* doi: 10.1002
- Giovagnini L., Sitran S., Montopoli M., Caparrotta L., Corsini M., Rosani C., Zanello P., Dou Q.P., Fregona D. 2008. Chemical and biological profiles of novel copper(II) complexes containing S-donor ligands for the treatment of cancer. *Inorg. Chem.* 47: 6336-6343.
- Gomez Ruiz S. 2010. Evolución y desarrollo de complejos metálicos con aplicación potencial
- como agentes antitumorales *An. Quím.* 106: 13–21.
- Goncalves A.P., Videira A., Soares P., Maximo V. 2011. Orthovanadate-induced cell death in RET/PTC1-harboring cancer cells involves the activation of caspases and altered signaling through PI3K/Akt/mTOR. *Life Sci* 12: 11–12
- Goodman, Gilman. Quimioterapia de las enfermedades neoplásicas. En *Las bases farmacológicas de la terapéutica*. Novena Edición. Editores JG Hardman y LE Limbird.
- Ed. McGraw-Hill Interamericana. 1996; 2(Sección X):1301-1368.
- Gonçalves A.P., Videira A., Soares P., Máximo V. 2011. Orthovanadate-induced cell death in RET/PTC1-harboring cancer cells involves the activation of caspases and altered signaling through PI3K/Akt/mTOR. *Life Sci.* 89: 371-377.
- Green D.R., Reed J.C., 1998. Mitochondria and apoptosis. *Science* 281:1309–1312.
- Guddneppanavar R., Bierbach U., 2007. Adenine-N3 in the DNA minor groove - an emerging target for platinum containing anticancer pharmacophores. *Anti-Cancer Agents Med. Chem.* 7: 125–138.
- Günther T.M., Kwiecinski M.R., Baron C.C., Felipe K.B., Farias M.S., da Silva F.O., Bücker N.C., Pich C.T., Ferreira E.A., Wilhelm Filho D., Verrax J., Calderon P.B., Pedrosa R.C. 2013. Sodium orthovanadate associated with pharmacological doses of ascorbate causes an increased generation of ROS in tumor cells that inhibits proliferation and triggers apoptosis.
- *Biochem Biophys Res Commun.* 430: 883-8..
- Haapala D.K., Jasmin C., Sinoussi F., Chermann J.C., Raynaud M. 1973. Inhibition of tumour virus RNA-dependent DNA polymerase by the heteropolyanion, silicotungstate. *Biomedicine.* 19:7-11.
- Habashi F., 2002. Two hundred years of vanadium. In: Tanner, M.F. *Ann. New York Acad. Sci.* 928: 22–38.
- Habich D. 1991. HIV-Infektion und AIDS. *Biologische Grundlagen und chemotherapeutische Ansätze Chemie in unserer Zeit.* 25: 295-307.
- Halliwell B., Gutteridge J.M., 1990. The antioxidants of human extracellular fluids. *Arch Biochem Biophys.* 280:1-8.

- Hamdy N.A., 1993. Role of biphosphonates in metabolic bone diseases. *Trends Endocrinol Metab.* 4: 19-25.
- Harding M.M., Mokdsi G. 2000. Antitumour metallocenes: structure-activity studies and interactions with biomolecules. *Curr. Med. Chem.* 7: 1289-1303.
- Herath. H.M., Silvio L.D., Evans J.R. 2005. Scandia--a potential biomaterial?. *J Mater Sci Mater Med.* 16:1061-5.
- Heremans H., Billiau A., Cassiman J.J., Mulier J.C., de Somer P. 1978. In vitro cultivation of human tumor tissues. II. Morphological and virological characterization of three cell lines. *Oncology.* 35: 246-52.
- Heringova P., Woods J., Mackay F.S., Kasparkova J., Sadler P.J., Brabec V. 2006. Transplatin is cytotoxic when photoactivated: enhanced formation of DNA cross-links *J. Med. Chem.* 2006, 49, 7792–7798
- Hertog M.G., Hollman P.C., Katan M.B., Kromhout D. 1993. Intake of potentially anticarcinogenic flavonoids and their determinants in adults in The Netherlands. *Nutr Cancer* 20: 21–29.
- Higuchi Y., 2004. Glutathione depletion-induced chromosomal DNA fragmentation associated with apoptosis and necrosis. *J. Cell Mol. Med.* 8: 455-464.
- Hill C.L., Hartnup M., Faraj M., Weeks M., Posser-Mc Cartha C., Schinazi F. 1989 *J. Inorg. Biochem.* 36: 156
- Hissin P., Hilf R. 1976. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Anal Biochem* 74: 214.
- Hopkins L.L Jr., Tilton B.E., 1966. Metabolism of trace amounts of vanadium 48 in rat organs and liver subcellular particles. *Am J Physiol* 211:169-172.
- Houchens D., Ovejera A., Barker A. 1978. The use of Atimic Nude Mice in Cancer Reasearch (Houchers D. and Ovejera A., eds.) 267-289.
- Huang C., Chen N., Ma W.Y., Dong Z., 1998. Vanadium induces AP-1 and NF-kappaB dependent transcription activity. *Int J Oncol*;13:711–715.
- Huang C., Zhang Z., Ding M., Li J., Ye J., et al., 2000. Vanadate induces p53 transactivation through hydrogen peroxide and causes apoptosis. *J. Biol. Chem.* 275: 32516–32522.
- Hwang C., Sinskey A.J., Lodish H.F., 1992. Oxidized redox state of glutathione in the endoplasmic-reticulum, *Science* 57: 1496–1502.
- Iannuzzi, M.M., Rieger, P.H., 1975. Nature of vanadium(IV) in basic aqueous solution. *Inorg. Chem.* 14: 2895-2899.
- Inoue M., Sato E.F., Nishikawa M., Park A.M., Kira Y., Imada I., Utsumi K., 2003. Mitochondrial generation of reactive oxygen species and its role in aerobic life, *Curr. Med. Chem.* 10: 2495–2505.
- Inouye Y., Take Y., Tokutake Y., Yoshida T., Yamamoto A., Yamase T., Nakamura S. 1990. Inhibition of replication of human immunodeficiency virus by a heteropolyoxotungstate (PM-19). *Chem. Pharm. Bull.* 38: 285-7.
- Jackson J.K., Min W., Cruz T.F., Cindric S., Arsenault L., Von Hoff D.D., Degan D., Hunter W.L., Burt H.M. 1997. A polymer-based drug delivery system for the antineoplastic agent bis(maltolato)oxovanadium in mice. *Br. J. Cancer.* 75: 1014-20.
- Jakupec A., Galanski M., Keppler B.K. 2003. Tumour-inhibiting platinum complexes--state of the art and future perspectives. *Rev. Physiol. Biochem.Pharmacol.* 146: 1-54.

- Jarocka I., Gęgotek A., Bielawska A., Bielawski K., Łuczaj W., Hodun T., Skrzydlewska E. 2013. Effect of novel dinuclear platinum(II) complexes on redox status of MOLT-4 leukemic cells. *Toxicol Mech Methods*. 23: 641-9.
- Jasmin C., Chermann J.C., Hervé G., Teze A., Souchay P., Boy-Loustau C., Raybaud N., Sinoussi F., Raynaud M. 1974. In vivo inhibition of murine leukemia and sarcoma viruses by the heteropolyanion 5-tungsto-2-antimoniate. *J. Natl. Cancer Inst.* 53: 469-74.
- Jasmin C., Raybaud N., Chermann J.C. 1973. In vitro effects of silicotungstate on some RNA viruses. *Biomedicine*. 18: 319-27.
- Kalinowska-Lis U., Ochocki J., Matlawska-Wasowska K. 2008. Trans geometry in platinum antitumor complexes, *Coord. Chem. Rev.* 252: 1328-1345.
- Kanna P.S., Mahendrakumar C.B., Chakraborty T., Hemalatha P., Banerjee P., Chatterjee M. 2003. Effect of vanadium on colonic aberrant crypt foci induced in rats by 1,2-dimethyl hydrazine, *World J. Gastroenterol.* 9: 1020–1027.
- Kanna P.S., Saralaya M.G., Samanta K., Chatterjee. M., 2005. Vanadium inhibits DNA-protein cross-links and ameliorates surface level changes of aberrant crypt foci during 1,2-dimethylhydrazine induced rat colon carcinogenesis. *Cell Biol. Toxicol.* 21: 41-52.
- Karmaker S., Saha T.K., Yoshikawa Y., Yasui H., Sakurai H. 2006. A novel drug delivery system for type 1 diabetes: insulin-mimetic vanadyl-poly(γ -glutamic acid) complex. *J Inorg Biochem.* 100:1535-46.
- Karoui H., Hogg N., Frejaville C., Tordo P., Kalyanaraman B., 1996. Characterization of sulfur- centered radical intermediates formed during the oxidation of thiols and sulfite by peroxyxynitrite-ESR-SPIN trapping and oxygen uptake studies, *J. Biol. Chem.* 271: 6000–6009.
- Katkar P., Coletta A., Castelli S., Sabino G.L., Couto R.A., Ferreira A.M., Desideri A. 2014. Effect of oxindolimine copper(II) and zinc(II) complexes on human topoisomerase I activity. *Metallomics.* 6:117-25.
- Kelland L.R., Abel G., McKeage M.J., Jones M., Goddard P.M., Valenti M., Murrer B.A., Harrap K.R., 1993. Preclinical antitumor evaluation of bis-acetato-amine-dichloro-cyclohexylamine platinum(IV): an orally active platinum drug. *Cancer Res.* 53: 2581–2586.
- Keller R.J., Sharma R.P., Grover T.A., Piette H., 1988. Vanadium lipid peroxidation: evidence for involvement of vanadyl and hydroxyl radicals. *Arch Biochem Biophys* 265:524–533.
- Kenneth N.S., Hucks GE Jr., Kocab A.J., McCollom A.L., Duckett C.S. 2014. Copper is a potent inhibitor of both the canonical and non-canonical NF κ B pathways. *Cell Cycle.* 13:1006-14.
- Kim R., Tanabe K., Uchida Y., Emi M., Inoue H., Toge T., 2002. Current status of the molecular mechanisms of anticancer drug-induced apoptosis. The contribution of molecular-level analysis to cancer chemotherapy. *Cancer Chemother Pharmacol* 50:343-352.
- Kinnula V.L. and Crapo J.D., 2004. Superoxide dismutases in malignant cells and human tumors. *free radic. Biol. Med.* 36:718-744.
- Kiss T., Kiss E., Micera G., Sanna D., 1998. The formation of ternary complexes between VO(maltolate)₂ and small bioligands. *Inorg. Chim. Acta* 283: 202-210.
- Klein A.V., Hambley T.W. Platinum drug distribution in cancer cells and tumors. *Chem. Rev.* 2009, 109: 4911–4920.

- Komura A., Hayashi M., Imanaga H., 1977. Hydrolytic behavior of Oxovanadium(IV) Ions. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 50: 2927-2931
- Kooy N.W., Royall J.A., Ischiropoulos H., Beckman J.S. 1994. Peroxynitrite-mediated oxidation of dihydrorhodamine 123. *Free Radic Biol Med.* 16: 149-56.
- Kramer H.J., Krampitz G., Backer A., Krampitz G., Meyer-Lehnert H., 1995. Vanadium-diascorbates are strong candidates for endogenous ouabain-like factors in human urine: effects on Na-K-ATPase enzyme kinetics. *Biochem Biophys Res Commun.* 213: 289-94.
- Kuntić V., Filipović I., Vujić Z. 2011. Effects of rutin and hesperidin and their Al(III) and Cu(II) complexes on in vitro plasma coagulation assays. *Molecules.* 16: 1378-1388.
- Kuo P.L., Hung J.Y., Huang S.K., Chou S.H., Cheng D.E., Jong Y.J., Hung C.H., Yang C.J., Tsai Y.M., Hsu Y.L., Huang M.S. (2011). Lung Cancer-Derived Galectin-1 Mediates Dendritic Cell Anergy through Inhibitor of DNA Binding 3/IL-10 Signaling Pathway. *J Immunol.* 186, 1521-1530.
- Lachowicz A., Höbold W., Thiele K.-H., 1975. ¹H-NMR-spektroskopische Untersuchung von Trialkylorthovanadaten. *Z. Anorg. Allg. Chem.* 418: 65-71.
- Lee J.C., Son Y.O., Pratheeshkumar P., Shi X. 2012. Oxidative stress and metal carcinogenesis *Free Radic Biol Med.* 53: 742-57.
- Levine R.L., Mosoni L., Berlett B.S., Stadtman E.R., 1996. Methionine residues as endogenous antioxidants in proteins, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93: 15036–15040.
- Lewin B. 2007. *Genes IX.* 6 ed. New York: Oxford University. 892pp.
- Lewis N.A., Liu F., Seymour L., Magnusen A., Erves T.R., Arca J.F., Beckford F.A., Venkatraman R., González-Sarrías A., Fronczek F.R., Vanderveer D.G., Seeram N.P., Liu A., Jarrett W.L., Holder A.A. 2012. Synthesis, characterization, and preliminary in vitro studies of vanadium(IV) complexes with a Schiff base and thiosemicarbazones as mixed-ligands. *Eur J Inorg Chem.* 4: 664-677.
- Li J., Elberg G., Sekar N., bin He Z., Shechter Y., 1997. Antilipolytic actions of vanadate and insulin in rat adipocytes mediated by distinctly different mechanisms. *Endocrinology* 138 : 2274–2279.
- Li L., Wataha J.C., Cate C., Zhang H., DiJulio D., Chung W.O. 2012. Ni(II) alters the NFκB signaling pathway in monocytic cells. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 100: 934-9.
- Liao W., Nutt M.A., Zhu M.G. 2009. The comet assay: a sensitive method for detecting DNA damage in individual cells. *Methods* 48: 46-53.
- Liasko R., Kabanos T.A., Karkabounas S., Malamas M., Tasiopoulos A.J., Stefanou D., Collery P., Evangelou A. 1998. Beneficial effects of a vanadium complex with cysteine, administered at low doses on benzo(alpha)pyrene-induced leiomyosarcomas in Wistar rats. *Anticancer Res.* 18: 3609-13.
- Link M.P., Goorin A.M., Miser A.W., Green A.A., Pratt C.B., Belasco J.B., Pritchard J., Malpas J.S., Baker A.R., Kirkpatrick J.A. 1986. The effect of adjuvant chemotherapy on relapse-free survival in patients with osteosarcoma of the extremity. *N Engl J Med.* 19: 1600-1606.
- Litter M. Quimioterapia del cáncer. Agentes alquilantes. Antimetabolitos. Antibióticos
- antineoplásicos. Alcaloides vegetales. En *Farmacología Experimental y Clínica.* Séptima

- Edición. Editorial El Ateneo. 1986b.
- Liu W., Gust R. 2013. Metal N-heterocyclic carbene complexes as potential antitumor metallodrugs. *Chem Soc Rev.* 42: 755-73.
- Liu F., Rabinovich G.A. 2005. Galectins as modulators of tumour progression. *Nature Rev Cancer* 5: 29-41.
- Liu J., Reuland D.J., Rosenhein L., Xin Cao Z., Franklin L.A., Ganguli S., 1997. Differential acute effects of oxovanadiums and insulin on glucose and lactate metabolism under in vivo and in vitro conditions. *Metabolism* 46: 562-572.
- Liu T.T., Liu Y.J., Wang Q., Yang X.G., Wang K., 2012. Reactive oxygen species mediated Cdc25C degradation results in differential antiproliferative activities of vanadate, tungstate, and molybdate in the PC-3 human prostate cancer cell line. *J. Biol. Inorg. Chem.* 17: 311-320.
- Lopez-Mediavilla C., Orfao A., Garcia M.V., Medina J.M., 1995. Changes in adult rat liver mitochondrial populations at different energy states analyzed by flow cytometry. *Biochim Biophys Acta* 1232:27-32.
- Lu Y., Cederbaum AI. 2008. CYP2E1 and oxidative liver injury by alcohol. *Free Radic Biol Med.* 44: 723-38.
- Lubber B., Candidus S., Handsbusch G., et al., 2000. Tumor derived mutated E-cadherin influences beta-catenin localization and increases susceptibility to actin cytoskeletal changes induced by pervanadate. *Cell Adhes Commun.* 7:391-408.
- Lyonnet B. y Martin E. 1899. L'emploi therapeutique des derives du vanadium. *Presse Med.* 1:191-192.
- MacDonald H.R., Blanc C., Lees R.K., Sordat B. 1986. Abnormal distribution of T-cell subsets in athymic mice. *J. Immunol.* 136: 4337-4339.
- Macías B., García I., Villa M.V., Borrás J., González-Álvarez M., Castiñeiras A. Oxidative DNA damage of mixed copper(II) complexes with sulfonamides and 1,10-phenanthroline. Crystal structure of [Cu(N-quinolin-8-yl-p-toluenesulfonamidate)₂(1,10-phenanthroline)]. *J. Inorg. Biochem.* (2003) 96, 367-374.
- Mailhes J.B., Hilliard C., Fuseler J.W., London S.N., 2003. Vanadate, an inhibitor of tyrosine phosphatases, induced premature anaphase in oocytes and aneuploidy and polyploidy in mouse bone marrow cells. *Mutat Res* 538:101-107.
- Malina J., Novakova O., Keppler B.K., Alessio E., Brabec V. 2001. Biophysical analysis of natural, double-helical DNA modified by anticancer heterocyclic complexes of ruthenium(III) in cell-free media. *J Biol Inorg Chem*, 6: 435-445.
- Manning D., Reed N., Shaffer C. 1973. Maintenance of skin xenografts of widely divergent phylogenetic origin on congenitally athymic (nude) mice. *J. Exp. Med.* 138: 448-494.
- Marchetti P., Susin S.A., Decaudin D., Gamen S., Castedo M., Hirsch T., et al., 1996. Apoptosis-associated derangement of mitochondrial function in cells lacking mitochondrial DNA. *Cancer Res* 56:2033-2038.
- Markopoulou S., Kontargirlis E., Batsi C., Tzavaras T., Trougakos I., Boothman D.A., Gonos E.S., Kolettas E. 2009. Vanadium induced apoptosis of HaCaT cells is mediated by c-fos and involves nuclear accumulation of clusterin. *FEBS J.* 276: 3784-3799.
- Marnett L.J., 1999. Lipid peroxidation — DNA damage by malondialdehyde. *Mut. Res.-Fund. Mol. Mech. Mutagen.* 424: 83-95.
- Marnett L.J., 2000. Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis* 21361-21370.

- Martín Santos C., Cabrera S., Ríos-Luci C., Padrón J.M., López Solera I., Quiroga A.G., Medrano M.A., Navarro-Ranninger C., Alemán J. 2013. Novel clioquinol and its analogous platinum complexes: importance, role of the halogen substitution and the hydroxyl group of the ligand. *Dalton Trans.* 42: 13343-8.
- Marzban L., Rahimian R., Brownsey R.W. McNeill J.H., 2002. Mechanisms by which bis(maltolato)oxovanadium(IV) normalizes phosphoenolpyruvate carboxykinase and glucose-6-phosphatase expression in streptozotocin-diabetic rats in vivo. *Endocrinology* 143: 4636–4645.
- Massart R., Contatn R., Fruchart J.M., Ciabrini J.P., Fournier M. 1977 P31 NMR studies on molybdc and tungstic heteropolyanions. Correlation between structur and chemical shift. *Inorg. Chem.* 16: 2916.
- Massey V., 1994. Activation of Molecular Oxygen by Flavins and Flavoproteins. *J. Biol. Chem.* 269: 22459-22462.
- Matarrese P., Tinari A., Mormone E., Bianco G.A., Toscano M.A., Ascione B. Rabinovich G.A., Malorni W. 2005. Galectin-1 sensitizes resting human T lymphocytes to Fas (CD95)-mediated cell death via mitochondrial hyperpolarization, budding, and fission. *J Biol Chem.* 280: 6969–6985.
- Mateen S., Raina K., Agarwal R. 2013. Chemopreventive and anti-cancer efficacy of silibinin against growth and progression of lung cancer. *Nutr Cancer.* 1: 3-11.
- Matsuyoshi N., Hamaguchi M, Taniguchi S, Nagafuchi A, Tsukita S, Takeichi M. 1992. Cadherin mediated cell-cell adhesion is perturbed by v-src tyrosine phosphorylation in metastatic fibroblasts. *J Cell Biol.* 118:703-14.
- Mayer B., Oberbauer R. 2003. Mitochondrial regulation of apoptosis. *News Physiol Sci.* 18: 89-94.
- McDonald F., Ford C.H., Casson A.G. 2004. *Molecular Biology of cancer.* 2ª edición. BIOS Scientific Publishers, E. U. A. 256pp.
- McNeill J.H., Yuen V.G., Dai S., Orvig C., 1995. Increased potency of vanadium using organic ligands. *Mol Cell Biochem* 153:175-80.
- Mehdi M., Z., Srivastava A. K., 2005. Organo-vanadium compounds are potent activators of the protein kinase B signaling pathway and protein tyrosine phosphorylation: Mechanism of insulinomimesis. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 440: 158–164.
- Mercurio F., Manning A. M., 1999. Multiple signals converging on NF-kappaB. *Curr Opin Cell Biol.* 11:226–32.
- Meshkini A., Yazdanparast R. 2010. Chemosensitization of human leukemia K562 cells to taxol by a Vanadium-salen complex. *Exp. Mol. Pathol.* 89: 334-342.
- Miao J.H., Wang S.Q., Zhang M.H., Yu F.B., Zhang L., Yu Z.X., Kuang Y. 2014. Knockdown of galectin-1 suppresses the growth and invasion of osteosarcoma cells through inhibition of the MAPK/ERK pathway. *Oncol Rep.* 32: 1497-1504.
- Micera G., Sanna D., Dess, A., Kiss T., Buglyo P., 1993. Complex-forming properties of α -hydroxycarboxylic acids with oxovanadium(IV)-ion. *Gazz. Chim. Ital.* 123: 573-577.
- Micera G., Sanna D., Kiss E., Garribba E., Kiss T., 1999. Oxovanadium (IV) complexes of phosphates of biological relevance: NAD⁺, NADP⁺ and thiamine mono- and diphosphate. *J. Inorg. Biochem.* 75: 303-309.
- Michibata H. y H. Sakurai. 1990. Vanadium in ascidians. En “Vanadium in Biological Systems”. Ed by Chasteen, N. D., editor. Kluwer Acad Publ. Dordrecht. 153–171.

- Michibata H., Uyama T., Ueki T., Kanamori K. 2002. Vanadocyte is a cell holding the key to resolve the highly selective accumulation and reduction of vanadium in ascidians. *Microsc. Res. Technol.* 56:421-434.
- Misra S., Pandeya K.B., Tiwari A.K., Ali A.Z., Saradamani T., Agawane S.B., Madhusudana K. 2012. α -Glucosidase inhibitory activities of some Oxovanadium(IV) complexes: Examples of low IC₅₀ Values. *International Journal of Nutrition and Metabolism.* 4: 11-18.
- Mitsui S., Ogata A., Yanagie H., Kasano H., Hisa T., Yamase T., Eriguchi M. 2006. Antitumor activity of polyoxomolybdate, [NH₃Pri]₆[Mo₇O₂₄].3H₂O, against, human gastric cancer model. *Biomed.Pharmacother.* 60: 353-8.
- Mohseny A.B., Hogendoorn P.C., Cleton-Jansen A.M. 2012. Osteosarcoma models: from cell lines to zebrafish. *Sarcoma.* 2012:417271. doi: 10.1155/2012/417271.
- Mohseny A.B., Machado I., Cai Y., Schaefer K.L., Serra M., Hogendoorn P.C., Llombart-Bosch A., Cleton-Jansen A.M. 2011. Functional characterization of osteosarcoma cell lines provides representative models to study the human disease. *Lab Invest.* 91: 1195-205.
- Molero J.C., Martínez C., Andres A., Satrustegui J., Carrascosa J.M., 1998. Vanadate fully stimulates insulin receptor substrate-1 associated phosphatidylinositol 3-kinase activity in adipocytes from young and old rats. *FEBS Lett* 425:298-304.
- Molero J.C., Pérez C., Martínez C., Villar M., Andrés A., Fermín Y., Carrascosa J.M., 2002. Activation of MAP kinase by insulin and vanadate in adipocytes from young and old rats. *Mol. Cell. Endocrinol.* 189: 77–84.
- Molinuevo M.S., Barrio D.A., Cortizo A.M., Etcheverry S.B., 2004. Antitumoral properties of two new vanadyl(IV) complexes in osteoblasts in culture: role of apoptosis and oxidative stress. *Cancer Chemother Pharmacol.* 53:163-72.
- Molinuevo M.S., Cortizo A.M., Etcheverry S.B.. 2008. Vanadium(IV) complexes inhibit adhesion, migration and colony formation of UMR106 osteosarcoma cells. *Cancer Chemother Pharmacol.* 61: 767-73.
- Mongold J.J., Cros G.H., Vian L., Tep A., Ramanadham S., Siou G., Diaz J., McNeill J.H., Serrano J.J., 1990. Toxicological aspects of vanadyl sulphate on diabetic rats: effects on vanadium levels and pancreatic B-cell morphology. *Pharmacol Toxicol* 67:192-198.
- Montiel-Dávalos A., Gonzalez-Villava A., Rodriguez-Lara V., Montaña L.F., Fortoul T.I., López-Marure R. 2012. Vanadium pentoxide induces activation and death of endothelial cells. *J. Appl. Toxicol.* 32: 26-33.
- Moreno-Jiménez M., Aristu J. 2007. Radioterapia combinada con quimioterapia en el tratamiento del cáncer de pulmón. *REV MED UNIV NAVARRA* 4: 13-33.
- Morinville A., Maysinger D., Shaver A., 1998. From Vanadis to Atropos: vanadium compounds as pharmacological tools in cell death signalling. *Trends Pharmacol Sci.*; 19: 452-460.
- Mosmann T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 65: 55-63.
- Mosseri R., Waner T., Shefi M., Shafir E., Meyerovitch J., 2000. Gluconeogenesis in non-obese diabetic (NOD) mice: in vivo effects of vandadate treatment on hepatic glucose-6-phosphatase and phosphoenolpyruvate carboxykinase. *Metabolism* 49: 321–325.

- Muglia C., Mercer N., Toscano M.A., Schattner M., Pozner R., Cerliani J.P., Gobbi R.P., Rabinovich G.A., Docena G.H. 2011. The glycan-binding protein galectin-1 controls survival of epithelial cells along the crypt-villus axis of small intestine. *Cell Death Dis.* 2: e163.
- Mukherjee B., Patra B., Mahapatra S., B Pratik., Tiwari A., Chatterjee M., 2004. Vanadium—an element of atypical biological significance. *Toxicology Letters* 150 135–143.
- Muñoz M., Berger M., Rosso M., Gonzalez-Ortega A., Carranza A., Coveñas R. 2014. Antitumor activity of neurokinin-1 receptor antagonists in MG-63 human osteosarcoma xenografts. *44: 137-46.*
- Nagai M., Vo N.H., Shin Ogawa L., Chimmanamada D., Inoue T., Chu J., Beaudette-Zlatanova B.C., Lu R., Blackman R.K., Barsoum J., Koya K., Wada Y. 2012. The oncology drug elesclomol selectively transports copper to the mitochondria to induce oxidative stress in cancer cells. *Free Radic. Biol. Med.* 52: 2142–2150.
- Narda G.E., Vega E.D., Pedregosa J.C, Etcheverry S.B, Baran E.J., 1992 Über die wechselwirkung des vanadyl (IV)-kations mit calcium hydroxylapatit. *Naturforsch* 47b, 395 - 398.
- Narla R.K., Dong Y., D’Cruz O.J., Navara C., Uckun F.M. 2000. Bis(4,7-dimethyl-1,10-phenanthroline) sulfatoxovanadium(IV) as a novel apoptosis-inducing anticancer agent. *Clin Cancer Res.* 6:1546-56.
- Narla R.K., Dong Y., Klis D., Uckun F.M. 2001a. Bis(4,7-dimethyl-1,10-phenanthroline) sulfatoxovanadium(IV) as a novel antileukemic agent with matrix metalloproteinase inhibitory activity. *Clin Cancer Res.* 7:1094-1101.
- Narla R.K., Chen C.L., Dong Y., Uckun F.M. 2001b. In vivo antitumor activity of bis(4,7-dimethyl-1,10-phenanthroline) sulfatoxovanadium(IV) (METVAN [VO(SO₄)(Me₂-Phen)₂]). *Clin. Cancer Res.* 7:2124-33.
- Narla R.K., Dong Y., Uckun F.M. 2001c. Apoptosis inducing novel anti-leukemic agent, bis(4,7-dimethyl-1,10 phenanthroline) sulfatoxovanadium(IV) [VO(SO₄)(Me₂-Phen)₂] depolarizes mitochondrial membranes. *Leuk Lymphoma.* 41: 625-634.
- Naso L.G., Ferrer E.G., Butenko N., Cavaco I., Lezama L., Rojo T., Etcheverry S.B., Williams P.A.M. 2011. Antioxidant, DNA cleavage, and cellular effects of silibinin and a new oxovanadium(IV)/silibinin complex. *J Biol Inorg Chem.* 16: 653-668.
- Naso L.G., Ferrer E.G., Lezama L., Rojo T., Etcheverry S.B., Williams P.A.M. 2010. Role of oxidative stress in the antitumoral action of a new vanadyl(IV) complex with the flavonoid chrysin in two osteoblast cell lines: relationship with the radical scavenger activity. *J Biol Inorg Chem.* 15: 889-902.
- Naso L.G., Lezama L., Rojo T., Etcheverry S.B., Valcarcel M., Roura M., Salado C., Ferrer E.G., Williams P.A. 2013. Biological evaluation of morin and its new oxovanadium(IV) complex as antioxidant and specific anti-cancer agents. *Chem Biol Interact.* 206: 289-301.
- Nechay B.R. Mechanisms of action of vanadium. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1984;

- Nielsen F.H., 1995. Vanadium in Mammalian Physiology and Nutrition. En Metal Ions in Biological Systems. Vanadium and its role in life, pp 543 - 573. Eds: Sigel H and Sigel A. New York. Marcel Dekker, INC.
- Nielsen F.H., Vanadium, in: B.L. O'Dell, R.A., 1997. Handbook of Nutritionally Essential Mineral Elements. Sunde (Eds.). Marcel Dekker, New York (chap. 22).
- Nriagu JO. 1998. History, Occurrence, and Uses of Vanadium. Vanadium in the Environment. Chemistry and biochemistry, 30: 1 - 24. Editor: Nriagu JO. New York Wiley J & Sons, INC.
- Nyska A., Kohen R., 2002. Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification, Toxicol. Pathol. 30: 620–650.
- Ogata A., Mitsui S., Yanagie H., Kasano H., Hisa T., Yamase T., Eriguchi M. 2005. A novel anti-tumor agent, polyoxomolybdate induces apoptotic cell death in AsPC-1 human pancreatic cancer cells. Biomed Pharmacother. 59: 240-4.
- Ogata A., Yanagie H., Ishikawa E., Morishita Y., Mitsui S., Yamashita A., Hasumi K., Takamoto S., Yamase T., Eriguchi M. 2008. Antitumour effect of polyoxomolybdates: induction of apoptotic cell death and autophagy in in vitro and in vivo models. Br. J. Cancer. 98: 399–409.
- Okajima T., Nakamura K., Zhang H., Ling N., Tanabe T., Yasuda T., Rosenfeld R.G. 1992. Sensitive colorimetric bioassays for insulin-like growth factor (IGF) stimulation of cell proliferation and glucose consumption: use in studies of IGF analogs. Endocrinology. 130: 2201-212.
- Onambele L.A., Koth D., Czaplewska J.A., Schubert U.S., Görls H., Yano S., Obata M., Gottschaldt M., Prokop A. 2010. Mitochondrial mode of action of a thymidine-based cisplatin analogue breaks resistance in cancer cells. 16: 14498-505.
- Orvig C., Abrams M.J. 1999. Medicinal Inorganic Chemistry: introduction. Chem. Rev. 99: 2201-2204.
- Pandey S. K., Anand-Srivastava M. B., Srivastava A. K., 1998. Vanadyl sulfate-stimulated glycogen synthesis is associated with activation of phosphatidylinositol 3-kinase and is independent of insulin receptor tyrosine phosphorylation. Biochemistry 37:7-14.
- Pandey SK, Chiasson JL, Srivastava AK. Vanadium salts stimulate mitogen-activated protein (MAP) kinases and ribosomal S6 kinases. Mol Cell Biochem 1995;153:69–78.
- Pandey S.K., Théberge J.F., Bernier M., Srivastava A.K., 1999. Phosphatidylinositol 3-kinase requirement in activation of the ras/C-raf-1/MEK/ERK and p70(s6k) signaling cascade by the insulinomimetic agent vanadyl sulfate. Biochemistry 38: 14667–14675.
- Papaioannou A., Manos M., Karkabounas S., Liasko R., Evangelou A.M., Correia I., Kalfakakou V., Pessoa J.C., Kabanos T. 2004. Solid state and solution studies of a vanadium(III)-L-cysteine compound and demonstration of its antimetastatic, antioxidant and inhibition of neutral endopeptidase activities. J. Inorg. Biochem. 98: 959-968.
- Pardini O.R., Amalvy J.I. 2008. FTIR, 1H-NMR spectra, and thermal characterization of water-based polyurethane/acrylic hybrids. J. Appl. Polym. Sci. 107: 1207-1214.
- Parker G.A. 1983. "Analytical Chemistry of Molybdenum", Springer, N. York.

- Partridge N.C., Alcorn D., Michelangeli V.P., Ryan G., Martin T.J., 1983. Morphological and biochemical characterization of four clonal osteogenic sarcoma cell lines of rat origin. *Cancer Res* 43: 4308-4314.
- Pautke C., Schieker M., Tischer T., Kolk A., Neth P., Mutshler W., Milz S. 2004. Characterization of Osteosarcoma Cell Lines MG-63, Saos-2 and U-2 OS in Comparison to Human Osteoblasts *Anticancer Res.* 24: 3743-3748.
- Pessoa J.C., Tomaz I., Kiss T., Buglyó P., 2001. The system VO₂⁺ + oxidized glutathione: a potentiometric and spectroscopic study. *J. Inorg. Biochem.* 84: 259-270.
- Pessoa C.J., Tomaz I., Kiss T., Kiss E., Buglyó P., 2002. The systems V/VO₂⁺-glutathione and related ligands: a potentiometric and spectroscopic study. *J. Biol. Inorg. Chem.* 7: 225-240.
- Perillo N.L., Pace K.E., Seilhamer J.J., Baum L.G. 1995. Apoptosis of T cells mediated by galectin-1. *Nature* 378: 736–739.
- Petanidis S., Kioseoglou E., Hadzopoulou-Cladaras M., Salifoglou A. 2013. Novel ternary vanadium-betaine-peroxido species suppresses H-ras and matrix metalloproteinase-2 expression by increasing reactive oxygen species mediated apoptosis in cancer cells. *Cancer Lett.* 335: 387-396.
- Peters K, Davis M., Howard B.W., et al. 2003. Mechanism of insulin sensitization by BMOV (bis maltolato oxo vanadium); unliganded vanadium (VO₄) as the active component. *J Inorg Biochem* 96:321-30.
- Pillai S.I., Subramanian S.P., Kandaswamy M., 2013. A novel insulin mimetic vanadium-flavonol complex: synthesis, characterization and in vivo evaluation in STZ-induced rats. *Eur J Med Chem.* 63:109-17.
- Pinchuk I., Schnitzer E., Lichtenberg D., 1998. Kinetic analysis of copper-induced peroxidation of LDL, *Biochim. Biophys. Acta-Lipids Lipid Metab.* 1389: 155–172.
- Piro O.E., Echeverría G.A., Arrambide G., Gambino D., Baran E.J. 2011. Crystal and molecular structure of a new hydroxylamido/amino acid oxovanadium(V) complex, [VO(NH₂O)₂(DL-methioninato)].H₂O *J. Chem Sci.* 66b: 752-754
- Poucheret P., Verma S., Grynepas M.D., McNeil, J.H., 1998. Vanadium and diabetes. *Mol. Cell. Biochem.* 188:73–80.
- Pope, M.T. 1983. "Heteropoly and isopoly Oxometalates", Springer, Berlin
- Pope, M.T., Müller A. 1991. Polyoxometalate Chemistry: An Old Field with New Dimensions in Several Disciplines. *Angew. Chem. Internat.* 30: 34-48.
- Prachayasittikul V., Prachayasittikul S., Ruchirawat S., Prachayasittikul V. 2013. 8-Hydroxyquinolines: a review of their metal chelating properties and medicinal applications. *Drug Design, Development and Therapy* 7: 1157.
- Prouillet C., Mazière J.C., Mazière C., Wattel A., Brazier M., Kamel S. 2004. Stimulatory effect of naturally occurring flavonols quercetin and kaempferol on alkaline phosphatase activity in MG-63 human osteoblasts through ERK and estrogen receptor pathway. *Biochem Pharmacol.* 67:1307-1313.
- Pyl A.M., Rehman J.P., Meshoyrer R., Kumar C.V., Turro N.J., Barton J.K. 1989. *J Am Chem Soc.* 111 3051–3058.
- Qin Y., Lu M., Gong X., 2008. Dihydrorhodamine 123 is superior to 2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetate and dihydrorhodamine 6G in detecting intracellular hydrogen peroxide in tumor cells. *Cell Biology International* 32: 224-228.

- Quarles L.D., Yohay D.A., Lever L.W., Caton R., Wenstrup R.J., 1992. Distinct proliferative and differentiated stages of murine MC3T3-E1 cells in culture: an in vitro model of osteoblast development. *J Bone Miner Res* 7:683-692.
- Rabinovich G.A., 1999. Galectins: an evolutionarily conserved family of animal lectins with multifunctional properties; a trip from the gene to clinical therapy. *Cell Death Differ.* 6: 711-22.
- Rabinovich G.A., Alonso C.R., Sotomayor C.E., Durand S., Bocco J.L., Riera C.M. 2000. Molecular mechanisms implicated in galectin-1-induced apoptosis: activation of the AP-1 transcription factor and downregulation of Bcl-2. *Cell Death Differ.*7: 747-753.
- Rabinovich G.A., Gabrilovich D., Sotomayor E.M. 2007a. Immunosuppressive strategies that are mediated by tumor cells. *Annu Rev Immunol* 25: 267-296.
- Rabinovich G.A., Iglesias M.M., Modesti N.M., Castagna L.F., Wolfenstein-Todel C., Riera C.M., Sotomayor C.E. 1998. Activated rat macrophages produce a galectin-1-like protein that induces apoptosis of T cells: biochemical and functional characterization. *J Immunol.* 160: 4831-40.
- Rabinovich G.A., Ilarregui J.M. 2009. Conveying glycan information into T-cell homeostatic programs: a challenging role for galectin-1 in inflammatory and tumor microenvironments. *Immunol Rev.* 230: 144–159.
- Rabinovich G.A., Toscano M.A., Jackson S.S., Vasta G.R. 2007b. Functions of cell surface galectin-glycoprotein lattices. *Curr Opin Struct Biol* 17: 513-520.
- Ramanadham S., Heyliger C., Gresser M.J., Tracey A.S., McNeill J.H., 1991. The distribution and half-life for retention of vanadium in the organs of normal and diabetic rats orally fed vanadium(IV) and vanadium(V). *Biol Trace Elem Res* 30:119-124.
- Ramirez P., Eastmond D.A., Laclette J.P., Ostrosky-Wegmann P., 1997. Disruption of microtubule assembly and spindle formation as a mechanism for the induction of aneuploid cells by sodium arsenite and vanadium pentoxide. *Mut Res* 386:291–298.
- Ray R.S., Ghosh B., Rana A., Chatterjee M. 2007. Suppression of cell proliferation, induction of apoptosis and cell cycle arrest: chemopreventive activity of vanadium in vivo and in vitro. *Int. J. Cancer.* 120: 13-23.
- Raybaud N., Jasmin C., Huppert J., Chermann J.C., Mathé G., Raynaud M. Study of antiviral activity of mineral condensed polyanions. II. Effect on vesicular stomatitis virus. *Rev Eur Etud Clin Biol.* 17: 295-9.
- Rehder, D. 1992. Structure and function of vanadium compounds in living organisms. *Biometals.* 5:3–12.
- Rehder D.,1999. The coordination chemistry of vanadium as related to its biological functions. *Coord. Chem. Rev.*182: 297-322.
- Rehder D. 2012. The potentiality of vanadium in medicinal applications. *Future. Med. Chem.* 4: 1823-1847.
- Reul B.A., Amin S.S., Buchet J.P., Ongemba L.N, Crans D.C, Brichard S.M., 1999. Effects of vanadium complexes with organic ligands on glucose metabolism: a comparison study in diabetic rats. *Br. J. Pharmacol.* 126: 467–477.
- Rhoads L.S., Silkworth W.T., Roppolo M.L., Whittingham M.S. 2010. Cytotoxicity of nanostructured vanadium oxide on human cells in vitro. *Toxicol In Vitro.* 24: 292-6.
- Richmond. R.C., Powers E.L. 1976. *Radiat. Res.* 68: 20-7.

- Rivadeneira J., Barrio D.A., Arrambide G., Gambino D., Bruzzone L., Etcheverry S.B. 2009. Biological effects of a complex of vanadium(V) with salicylaldehyde semicarbazone in osteoblasts in culture: mechanism of action. *J. Inorg. Biochem.* 103: 633-642.
- Rivadeneira J., Di Virgilio A.N., Barrio D.A., Muglia C.I., Bruzzone L., Etcheverry S.B. 2010. Cytotoxicity of a Vanadyl(IV) Complex with a Multidentate Oxygen Donor in Osteoblast Cell Lines in Culture. *Med. Chem.* 6: 9-23.
- Rosenberg B. i 1980) en “Metals Ions in Biology and Systems” (H. Sigel, Ed.) Vol. 11, 127-96, M. Dekker. New York
- Rosenberg R., van Camp L., Krigas T. 1965. Inhibition of cell division in *Escherichia coli* by electrolysis products from a platinum electrode *Nature* 205: 698-9
- Rosenberg B., van Camp L., Trosko J.E., Mansour V.H. 1969. Platinum compounds: a new class of potent antitumour agents. *Nature* 222: 385-6.
- Rozenbaum W., Dormont D., Spire B., Vilmer E., Gentilini M., Griscelli C., Montagnier L., Barre-Sinoussi F., Chermann J.C. 1985. Antimoniotungstate (HPA 23) treatment of three patients with AIDS and one with prodrome. *Lancet.* 1:450-1.
- Rubinson K.A., 1981. Concerning the form of biochemically active vanadium. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 212: 65-84.
- Rubinstein N., Alvarez M., Zwirner N.W., Toscano M.A., Ilarregui J.M., Bravo A., Mordoh J., Fainboim L., Podhajcer O.L., Rabinovich G.A. 2004. Targeted inhibition of galectin-1 gene expression in tumor cells results in heightened T cell mediated rejection; A potential mechanism of tumor-immune privilege. *Cancer Cell.* 5: 241-251.
- Rucker R.B., Lonnerdal B., C.L. Keen, 1994. Intestinal absorption of nutritionally important trace elements, in: L.R. Johnson (Ed.), *Physiology of the Gastrointestinal Tract*, 3rd ed., Raven Press, New York, (chap. 66).
- Rygaard J. 1969. Heterotransplantation of a human malignant tumour to “nude” mice. *Acta Pathol. Microbiol. Scand* 77: 761-762.
- Sak K. 2014. Cytotoxicity of dietary flavonoids on different human cancer types. *Pharmacogn Rev.* 8: 122-146.
- Sam M., Hwang J.H., Chanfreau G., Abu-Omar M.M. 2004. Hydroxyl radical is the active species in photochemical DNA strand scission by bis(peroxo)vanadium(V)phenanthroline. *Inorg Chem.* 43: 8447-55.
- Sakahira H., Enari M., Nagata S. 1998. Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature* 391:96-99.
- Sakurai H., 1994. Vanadium distribution in rats and DNA cleavage byvanadyl complex: Implication for vanadium toxicity and biological effects. *Envir Health Perspect.* 3: 35-36.
- Sakurai H., Shimomura S., Ishizu K., 1981. Cysteine methylester-oxovanadium (IV) complex, preparation and characterization. *Inorg. Chim. Acta* 55: L67-L69.
- Salmon S.E., Sartorelli M.D. Quimioterapia del cáncer. En *Farmacología Básica y Clínica*. Cuarta Edición. Katzung BG. Ed. El Manual Moderno SA de CV. México. 1991; 56:685-715.
- Samanta S., Swamy V., Suresh D., Rajkumar M., Rana B., Rana A., Chatterjee M. 2008. Protective effects of vanadium against DMH-induced genotoxicity and carcinogenesis in rat colon: removal of O6-methylguanine DNA adducts, p53

expression, inducible nitric oxide synthase downregulation and apoptotic induction, *Mutat. Res.* 650: 123–131.

- Sasmal P.K., Patra A.K., Nethaji M., Chakravarty A.R. 2007. DNA cleavage by new oxovanadium(IV) complexes of N-salicylidene alpha-amino acids and phenanthroline bases in the photodynamic therapy window. *Inorg Chem.* 46: 11112-21.
- Sastre J., Pallardo F.V., Vina J., 2000. Mitochondrial oxidative stress plays a key role in aging and apoptosis. *Iubmb. Life* 49: 427-435.
- Schonfeld B., Glemser O. 1975. *Z. Naturforsch.* 30b: 827-30.
- Scrivens P.J., Alaoui-Jamali M.A., Giannini G., Wang T., Loignon M., Batist G., Sandor V.A. 2003. Cdc25A-inhibitory properties and antineoplastic activity of bisperoxovanadium analogues. *Mol. Cancer Ther.* 2: 1053–1059.
- Sekar N., Li J., He Z., Gefel D., Shechter Y., 1999. Independent signal-transduction pathways for vanadate and for insulin in the activation of glycogen synthase and glycogenesis in rat adipocytes. *Endocrinology* 140: 1125-1131.
- Sethi G., Sung B., Aggarwal B.B. 2008. Nuclear factor-kappaB activation: from bench to bedside. *Exp. Biol. Med.* 233: 21–31.
- Setyawati I.A., Thompson K.H., Yuen V.G, Sun Y., Battell M., Lyster D.M., Vo C., Ruth T.J., Zeisler S, McNeill J.H., Orvig C., 1998. Kinetic analysis and comparison of uptake, distribution, and excretion of ⁴⁸V-labeled compounds in rats. *J Appl Physiol* 84: 569-575.
- Shechter Y., Goldwaser I., Mironchik M., Fridkin M., Gefel D., 2003. Historic perspective and recent developments on the insulin-like actions of vanadium; toward developing vanadium-based drugs for diabetes. *Coord. Chem. Rev.* 237: 3-11.
- Shechter Y., Li J., Meyerovitch J., Gefel D., Bruck R., Elberg G., Miller D.S, Shisheva A., 1995. Insulin-like actions of vanadate are mediated in an insulin-receptor-independent manner via nonreceptor protein tyrosine kinases and protein phosphotyrosine phosphatases. *Mol Cell Biochem.* 153:39-47.
- Shechter Y., Shisheva, A., 1993. Vanadium salts and the future treatment of diabetes. *Endavour* 17: 27-31.
- Sherr C.J. 2000. The Pezcoller lecture: cancer cell cycles revisited. *Cancer Res.* 60: 3695–3698.
- Sheikh M.S., Huang Y. 2003. Death receptor activation complexes: it takes two to activate TNF receptor 1. *Cell Cycle.* 2: 550-2.
- Shi X., Dalal N.S., 1993. Vanadate-mediated hydroxyl radical generation from superoxide radical in the presence of NADH: Haber-Weiss vs Fenton mechanism. *Arch Biochem Biophys.* 307: 336-341.
- Shisheva A., Shechter Y., 1992. Quercetin selectively inhibits insulin receptor function in vitro and the bioresponses of insulin and insulinomimetic agents in rat adipocytes. *Biochemistry* 31:8059-8063.
- Shukla R., Barve V., Padhye S., Bhonde R. 2006. Reduction of oxidative stress induced vanadium toxicity by complexing with a flavonoid, quercetin: a pragmatic therapeutic approach for diabetes. *Biometals* 19: 685-693.
- Shukla R y Bhonde R. R., 2008. Adipogenic action of vanadium: a new dimension in treating diabetes. *BioMetals* 21: 205-210.
- Silvestri F., Ribatti D., Nico B., Silvestri N., Romito A., Dammacco F., 1995. Apoptosis or programmata cell death: regulatory and pathophysiological mechanisms. *Ann Ital Med Int* 10:7-13.

- Singh N.P., McCoy M.T., Tice R.R., Schneider E.L. 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.* 175: 184-191.
- 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. 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem.* 150: 76-85.
- Soumya R.S., Reshmi R., Jomon S., Antu K.A., Riya M.P., Raghu K.G. 2014. Synthesis, characterization and evaluation of the antioxidant potential of vanadium encapsulated guar gum nanoparticles. *Food Funct.* 5:535-44.
- Stadtman E.R., 1992. Protein oxidation and aging, *Science* 257: 1220–1224.
- Stadtman E.R., 2001. Protein oxidation in aging and age-related diseases.
- Stadtman E.R., 2004. Role of oxidant species in aging. *Curr. Med. Chem.* 11: 1105–1112.
- Stanley K.T., VanDort C., Motyl C., Endres J., Fox D.A. 2006. Immunocompetent properties of human osteoblasts: interactions with T lymphocytes. *J Bone Miner Res.* 21:29-36.
- Stathopoulos G.P., Boulikas T., Kourvetaris A., Stathopoulos J.G. 2006. Liposomal oxaliplatin in the treatment of advanced cancer: a phase I study. *Anticancer Res.* 26:1489-93.
- Stathopoulos G.P., Boulikas T., Vougiouka M., Deliconstantinos G., Rigatos S., Darli E. Viliotou V., Stathopoulos J.G. 2005. Pharmacokinetics and adverse reactions of a new liposomal cisplatin (Lipoplatin): phase I study. *Oncol. Rep.* 13: 589–595.
- Stopper H., Muller S.O. 1997. Toxicol In Vitro. Micronuclei as a biological endpoint for genotoxicity: A minireview. 11: 661-7.
- Strasberg R. M., y Rieber, M. 1995. Suppression of cyclin D1 but not cdk4 or cyclin A with induction of melanoma terminal differentiation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 216: 422–427.
- Strianese M., Basile A., Mazzone A., Turco M.C., Pellechia C., 2013. Therapeutic potential of a pyridoxal-based vanadium(IV) complex showing selective cytotoxicity for cancer versus healthy cells. *J Cell Physiol.* 228: 2202-9.
- Sudo H., Kodama H.A, Amagai Y., Yamamoto S., Kasai S., 1983. In vitro differentiation and calcification in a new clonal osteogenic cell line derived from newborn mouse calvaria. *J Cell Biol* 96:191-198.
- Suzuki A., Guicheux J., Palmer G., Miura Y., Oiso Y., Bonjour J.P., Caverzasio J. 2002. Evidence for a role of p38 MAP kinase in expression of alkaline phosphatase during osteoblastic cell differentiation. *Bone.* 30: 91-8.
- Takahara P.M., Frederick C.A., Lippard S.J. 1996. Crystal structure of the anticancer drug cisplatin bound to duplex DNA. *J. Am. Chem. Soc.* 118: 12309–12321
- Takenaga K. 1996. Suppression of metastatic potential of high-metastatic Lewis lung carcinoma cells by vanadate, an inhibitor of tyrosine phosphatase, through inhibiting cell-substrate adhesion. *Invasion Metastasis.* 16: 97-106.
- Thannickal V.J., Fanburg B.L., 2000. Reactive oxygen species in cell signaling, *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 279: L1005–L1028.
- Thompson H.J., Chasteen D.N, Neeker L., 1984. Dietary vanadyl (IV) sulfate inhibits chemically-induced mammary carcinogenesis. *Carcinogenesis.* 5:849–851.
- Thompson K.H., 1999. Vanadium and diabetes. *Biofactors* 10:43-51.

- Thompson K.H., Battell M., McNeill J.H., 1998. Toxicology of vanadium in mammals. In *Vanadium in the environment Part 2*. Edited by JO Nriagu, 21-38.
- Thompson K.H., Leichter J., McNeil J.H., 1993. Studies of vanadyl sulfate as a glucose-lowering agent in STZ diabetic rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 97, 1549–1555.
- Thompson K.H., McNeill J.H., Orvig C., 1999. Vanadium compounds as insulin mimics. *Chem. Rev.* 99: 2561-2571.
- Thompson K.H., Orvig C., 2006. Vanadium in diabetes: 100 years from Phase 0 to Phase I *Journal of Inorganic Biochemistry* 100:1925–1935.
- Ting H., Deep G., Agarwal R. 2013. Molecular mechanisms of silibinin-mediated cancer chemoprevention with major emphasis on prostate cancer. *AAPS J.* 3: 707-16.
- Trainer D.L., Kline T., McCabe F.L., Faucette L.F., Field J., Chaikin M., Anzano M., Rieman D., Hoffstein S., Li D.J. 1988. Biological characterization and oncogene expression in human colorectal carcinoma cell lines. *Int J Cancer.* 41: 287-96.
- Trudel S., Paquet M.R., Grinstein S., 1991. Mechanism of vanadate-induced activation of tyrosine phosphorylation and of the respiratory burst in HL60 cells. Role of reduced oxygen metabolites. *Biochem J.* 276:611–619.
- Tsao D.A., Tseng W.C., Chang H.R. 2011. The expression of RKIP, RhoGDI, galectin, c-Myc and p53 in gastrointestinal system of Cr(VI)-exposed rats. *J Appl Toxicol.* 31: 730-40.
- Upreti RK. 1995. Membrane-vanadium interaction: a toxicokinetic evaluation. *Mol. Cell. Biochem.* 153:167-71.
- Uthus E.O., Nielsen F.H., 1990. Effect of vanadium, iodine and their interaction on growth, blood variables, liver trace elements and thyroid status indices in rats. *Magn Trace Elem* 9: 219-226.
- Vale C.L., Tierney J.F., Davidson S.E., Drinkwater K.J., Symonds P. 2010. Substantial improvement in UK cervical cancer survival with chemoradiotherapy: results of a Royal College of Radiologists' audit. *Clin Oncol (R Coll Radiol).* 22:590-601
- Valko M., Rhodes C.J., Moncol J., Izakovic M., Mazur M., 2006. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions.* 160: 1–40.
- van Engeland M., Kuijpers H.J., Ramaekers F.C., Reutelingsperger C.P., Schutte B. 1997. Plasma membrane alterations and cytoskeletal changes in apoptosis. *Exp Cell Res.* 235: 421-30.
- van Rijt S.H., Romero-Canelón I., Fu Y., Shnyder S.D., Sadler P.J. 2014. Potent organometallic osmium compounds induce mitochondria-mediated apoptosis and S-phase cell cycle arrest in A549 non-small cell lung cancer cells. *Metallomics.* 6: 1014-22.
- Vasta G.R. 2012. Galectins as pattern recognition receptors: structure, function, and evolution. *Adv Exp Med Biol.* 946: 21-36.
- Vilas Boas L.V. y Costa Pessoa J., 1987. In *Comprehensive Coordination Chemistry*. 3: ch. 33. Eds: Wilkinson, G., Sir, Gillard, R.D., McCleverty, J.A. Pergamon Press: New York
- Wada J., Makino H. 2001. Galectins, galactoside-binding mammalian lectins: clinical application of multi-functional proteins. *Acta Med Okayama.* 55: 11-7.
- Weinberg, R.A. 1996. How Cancer Arises. *Sci Am.* 275: 62-70.

- Weiss G.R., Kisner D.L., Kihn J.G., Melink T.J., Myers J.W., Von Hoff D.D., en: H. M. Pinedo, B. A. Chabner, Eds., *Cancer Chemotherapy Annual 6* Elsevier: New York, 1984.
- Wilkinson M.G, Millar J.B., 2000. Control of the eukaryotic cell cycle by MAP kinase signaling pathways. *FASEB J.* 14:2147-57.
- Willsky G.R, White D.A, McCabe B.C., 1984. Metabolism of added orthovanadate to vanadyl and high-molecular-weight vanadates by *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 259: 13273–13281.
- Wiltshaw E. 1979. *Platinum Metals Rev.* 23: 90-8
- Wu Y., Ma Y., Xu Z., Wang D., Zhao B., Pan H., Wang J., Xu D., Zhao X., Pan S., Liu L., Dai W., Jiang H. 2014. Sodium orthovanadate inhibits growth of human hepatocellular carcinoma cells in vitro and in an orthotopic model in vivo. *Cancer Lett.* 351: 108-16.
- Wyllie A.H., Kerr J.F., Currie A.R. 1980. Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol.* 68: 251-306.
- Xu K. and Thornalley P.J., 2001. Involvement of glutathione metabolism in the cytotoxicity of the phenethyl isothiocyanate and its cysteine conjugate to human leukaemia cells in vitro. *Biochem. Pharmacol.* 61: 165-177.
- Xue X., Lu Z., Tang D., Yao J., An Y., Wu J., Li Q., Gao W., Xu Z., Qian Z., Dai C., Wei J., Miao Y., Jiang K.. 2011. Galectin-1 secreted by activated stellate cells in pancreatic ductal adenocarcinoma stroma promotes proliferation and invasion of pancreatic cancer cells: an in vitro study on the microenvironment of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Pancreas* 40: 832-839.
- Yamaguchi T., Watanabe S., Matsumura Y., Tokuoka Y., Yokoyama A. 2012. Synthesis of oxovanadium complexes and their apoptosis-inducing activity in leukemia cells. *Chem Pharm Bull (Tokyo).* 60: 508-512.
- Yamase T., Fujita H., Fukushima K. 1988 Medical chemistry of polyoxometalates. Part 1. potent antitumor activity of polyoxomolybdates on animal transplantable tumors and human cancer xenograft. *Inorg Chim Acta.* 151:15–18.
- Yamase T., Sasaki R., Ikawa T. 1981. Photochemical studies of the alkylammonium molybdates. Part 5. Photolysis in weak acid solutions. *J. Chem. Soc. Dalton Transact.* 628-32
- Yamazaki Y., Tsuruga M., Zhou D., Fujita Y., Shang X., Dang Y., Kawasaki K., Oka S., 2000. Cytoskeletal disruption accelerates caspase-3 activation and alters the intracellular membrane reorganization in DNA damage-induced apoptosis. *Exp Cell Res.* 259: 64-78.
- Yang, R.Y., Rabinovich, G.A., and Liu, F.T. (2008). Galectins: structure, function and therapeutic potential. *Expert Rev Mol Med* 10: 17.
- Yazihan N., Koçak M.K., Akçıl E., Erdem O., Sayal A., Güven C., Akyürek N. 2011. Involvement of galectin-3 in cadmium-induced cardiac toxicity. *Anadolu Kardiyol Derg.* 2011 Sep;11(6):479-84.
- Ye J., Ding M., Leonard S.S., Robinson V.A., Millecchia L., Zhang X., Castranova V., Vallyathan V., Shi X. 1999. Vanadate induces apoptosis in epidermal JB6 P+ cells via hydrogen peroxidemediated reactions. *Mol Cell Biochem.* 202: 9-17.
- Yin J.J., Pollock C.B., Kelly K. 2005. Mechanisms of cancer metastasis to the bone. *Cell Res.* 15: 57-62.

- Yoneda T., Hiraga T. 2005. Crosstalk between cancer cells and bone microenvironment in bone metastasis. *Biochem Biophys Res Commun.* 328: 679-87.
- Yuan B.Z., Jefferson A.M., Millecchia L., Popescu N.C., Reynolds S.H., 2007. Morphological changes and nuclear translocation of DLC1 tumor suppressor protein precede apoptosis in human non-small cell lung carcinoma cells. *Exp Cell Res.* 313:3868-3880.
- Yuen V.G., Orvig C., Thompson K.H., McNeill J.H., 1993. Improvement in cardiac dysfunction in streptozotocin-induced diabetic rats following chronic oral administration of bis(maltolato)oxovanadium(IV). *Can J Physiol Pharmacol.* 71:270-276.
- Yuen V.G., Orvig C., McNeill J.H., 1993. Glucose-lowering effects of a new organic vanadium complex, bis(maltolato)oxovanadium(IV). *Can J Physiol Pharmacol* 71:263-269.
- Zhai F., Wang X., Li D., Zhang H., Li R., Song L. 2009. Synthesis and biological evaluation of decavanadate $\text{Na}_4\text{Co}(\text{H}_2\text{O})_6\text{V}_{10}\text{O}_{28}\cdot 18\text{H}_2\text{O}$. *Biomed. Pharmacother.* 63: 51–55.
- Zhang J., Brodbelt J.S., Wang J. 2005. Threshold dissociation and molecular modeling of transition metal complexes of flavonoids. *J Am Soc Mass Spectrom* 16:139–151.
- Zhang Z., Huang, C., Li J., Leonard S.S., Lanciotti R., Butterworth L., Shi X., 2001. Vanadate-induced cell growth regulation and the role of reactive oxygen species. *Arch. Biochem. Biophys.* 392: 311-320
- Zhang Z., Huang C., Li J., and Shi X., 2002. Vanadate-induced cell growth arrest is p53-dependent through activation of p21 in C141 cells. *J Inorg. Biochem.* 89:142–148.
- Zhang Z, Leonard SS, Huang C, Vallyathan V, Castranova V, Shi X., 2003. Role of reactive oxygen species and MAPKs in vanadate-induced G(2)/M phase arrest. *Free Radic Biol Med.* 34:1333-1342.
- Zhang Y.L., Wang X.S., Fang W., Cai X.Y., Li H.Z., Mao J.W., Jin X.B., Bai Y.L., Lu J.Z. 2013. In vitro study of the cytotoxicities of two mixed-ligand oxovanadium complexes on human hepatoma cells. *Pharmazie.* 68: 827-834.
- Zhao G., Lin H. 2005. Metal complexes with aromatic N-containing ligands as potential agents in cancer treatment. *Curr Med Chem Anticancer Agents.* 5: 137-47.
- Zhao J., Wu J.X., Yang W. 2013. Expression of caspase-3, Bcl-2, and Bax in pentavalent vanadium-induced neuronal apoptosis *Chinese J. of industrial hygiene and occupational diseases.* 31: 589-592.
- Zhao Y., Ye L., Liu H., Xia Q., Zhang Y., Yang X., Wang K. 2010. Vanadium compounds induced mitochondria permeability transition pore (PTP) opening related to oxidative stress. *J Inorg Biochem.* 104: 371-8.
- Zhou J, Sargiannidou I, Tuszynski G.P. 2000. The role of adhesive proteins in the hematogenous spread of cancer. *In Vivo.* 14:1999–2080.

8. PUBLICACIONES

**“Noticias de ayer, EXTRA EXTRA”
Noticias de Ayer, Un Baión para el
ojo idiota, 1988. Patricio rey y sus
redonditos de ricota.**

- 1) León I.E** , Etcheverry S.B , Parajón-Costa B.S , Baran E.J
Spectroscopic Characterization of an Oxovanadium(IV) Complex of Oxodiacetic Acid and /o/-Phenanthroline. Bioactivity on Osteoblast-Like Cells in Culture
Biol Trace Elem Res. 2012 147:403–407
- 2) León I.E**, Ana L. Di Virgilio, Daniel A. Barrio, Gabriel Arrambide, Dinorah Gambino, Susana B. Etcheverry
Hydroxylamido/ amino acid complexes of oxovanadium(V). Toxicological study in cell culture and in a zebrafish model.
Metallomics 2012 4(12):1287-96
- 3) León I.E**, Di Virgilio A.L., Porro V., Muglia C. Naso L.G., William P.A.M., Bollati-Fogolin M. and Etcheverry S.B.
Antitumor properties of a vanadyl(IV) complex with the flavonoid chrysin [VO(chrysin)₂EtOH]₂ in a human osteosarcoma model: role of the oxidative stress and apoptosis.
Dalton Transaction 2013 42(33): 11868- 11880.
- 4) León I.E**, Etcheverry S.B., Parajon-Costa B. and Baran E.J
Spectroscopic Characterization of an Oxovanadium(IV) Complex of Oxodiacetic Acid and 2,2'-Bipyridine. Bioactivity on Osteoblast-Like Cells in Culture.
Journal .Mex. Chem. Soc. 2013 57(3): 175-179.
- 5) León I.E**, Butenko N, Di Virgilio A.L., Muglia C. Baran E.J., Cavaco I. and Etcheverry S.B.
Vanadium and cancer treatment: antitumoral mechanisms of three oxovanadium(IV) complexes on a human osteosarcoma cell line
Journal of Inorganic Biochemistry 2014 134: 106–117
- 6) León I.E**, Porro V. Di Virgilio A.L, Naso L.G, William P.A.M, Bollati Fogolin M. Etcheverry S.B.
Antiproliferative and apoptosis-inducing activity of an oxovanadium(IV) complex with the flavonoid silibinin against osteosarcoma cells
Journal of Biological Inorganic Chemistry 2014 19(1):59-74.
- 7) León I.E.**, Porro V., Astrada S., Egusquiza G., Cabello C. Bollati-Fogolin M. and Etcheverry S.B
Polyoxometalates as antitumor agents: Bioactivity of a new polyoxometalate with copper on a human osteosarcoma model
Chemico Biol Interactions 2014 222: 87-96