

Dr. Luis Amado Ayala Pérez  
Director de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud  
PRESENTE

Por este medio le informo del término del Servicio Social, cuyos datos son los siguientes :

Fecha de Recepción	Día	Mes	Año	Fecha de Aprobación	Día	Mes	Año
--------------------	-----	-----	-----	---------------------	-----	-----	-----

**Datos del Alumno**

Nombre : <b>Andrea Belem Barrales Noguez</b>	
Matrícula : <b>2173029968</b>	Licenciatura : <b>Química Farmacéutica Biológica</b> <input type="text"/>
Domicilio : <b>Calzada del hueso # 836 interior 6, Coapa, Haciendas de Coyoacán, Coyoacán, 04970, CDMX</b>	
Teléfono : <b>761 734 3272</b>	Celular : <b>5569120318</b>
Correo Electrónico : <b>andreabarralesn@gmail.com</b>	CURP : <b>BANA991217MMCRGN17</b>

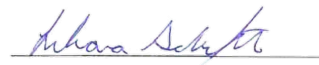
**Datos del Proyecto**

Nombre del Proyecto : <b>Efecto antineoplásico de un compuesto de coordinación de cobre en cultivos en monocapa de células de glioblastoma humano en condiciones normóxicas e hipóxicas; Mecanismos moleculares y celulares de acción.</b>							
Lugar donde se realizó el Servicio Social : <b>Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel Velasco Suárez.</b>							
Dependencia : <b>Secretaría de Salud</b>							
Entidad Federativa : <b>Distrito Federal</b>							
Municipio : <b>Tlalpan</b>	Localidad : <b>La fama</b>						
Fecha de Inicio	Día	Mes	Año	Fecha de Término	Día	Mes	Año
	<b>3</b>	<b>3</b>	<b>2022</b>		<b>3</b>	<b>9</b>	<b>2022</b>

**PARA SER LLENADO POR LOS ASESORES**

Sector: <b>3.- Público</b> <input type="text"/>	Tipo: <b>1.- Externo</b> <input type="text"/>
Orientación: <b>8.- Salud, Alimentación Y Nutrición</b> <input type="text"/>	

**FIRMAS**

  
**Liliana Schifter Aceves, No. económico 33389**  
Asesor Interno  
Nombre, firma y No. Económico

**María Cristina Trejo Solís, No. de cédula profesional 2051150**  
Asesor Externo  
Nombre, firma y No. Económico

**Andrea Belem Barrales Noguez**  
Alumno  
Nombre, firma

**Vo. Bo. de la Comisión**  
Nombre y firma de la persona que autoriza

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA  
UNIDAD XOCHIMILCO

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD  
DEPARTAMENTO DE SISTEMAS BIOLÓGICOS  
LIC. EN QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGICA

INSTITUTO NACIONAL DE NEUROLOGÍA Y NEUROCIRUGÍA  
MANUEL VELASCO SUÁREZ

MARZO-SEPTIEMBRE DE 2022

“EFECTO ANTINEOPLÁSICO DE UN COMPUESTO DE COORDINACIÓN DE COBRE  
EN CULTIVOS EN MONOCAPA DE CÉLULAS DE GLIOBLASTOMA HUMANO EN  
CONDICIONES NORMÓXICAS E HIPÓXICAS: MECANISMOS MOLECULARES Y  
CELULARES DE ACCIÓN”

ANDREA BELEM BARRALES NOGUEZ - 2173029968



---

Dra. Liliana Schifter Aceves  
No. Económico: 33389  
Asesor interno



---

ICM. María Cristina Trejo Solís  
Cédula profesional: 2051150  
Asesor externo

## Índice

INTRODUCCIÓN.....	1
ANTECEDENTES.....	2
¿Qué es el cáncer?.....	2
Origen y factores de riesgo.....	2
Cáncer en México .....	2
Glioblastoma multiforme .....	3
Tratamiento.....	4
Cirugía .....	5
Radioterapia.....	5
Quimioterapia y radioterapia .....	5
Terapias emergentes .....	6
Compuestos de coordinación de cobre.....	7
Dicloroacetato (DCA).....	8
Mecanismo de acción.....	8
Farmacología.....	9
OBJETIVOS.....	9
General:.....	9
Específicos:.....	9
METODOLOGÍA.....	10
• Cultivos celulares en monocapa .....	10
• Determinación de marcadores proliferativos y apoptóticos por la técnica de Western Blot.....	11
• Técnica de TUNEL.....	11
• Determinación de las especies reactivas de oxígeno .....	12
• Análisis estadístico .....	12
ACTIVIDADES REALIZADAS .....	12
• Cultivos celulares en monocapa .....	12
• Determinación de marcadores proliferativos y apoptóticos por la técnica de Western blot.....	14
• Ensayo de TUNEL.....	18
• Determinación de las especies reactivas de oxígeno.....	19
• Ensayo de Migración.....	20

METAS ALCANZADAS .....	20
RESULTADOS Y CONCLUSIONES .....	21
RECOMENDACIONES .....	27
CONCLUSION GENERAL .....	27
BIBLIOGRFÍA .....	28
ANEXOS .....	30

## INTRODUCCIÓN

De los tumores malignos, el 2% corresponde a neoplasias primarias del sistema nervioso central, con una incidencia de 5-8/100,000 [1]. Los tumores cerebrales más frecuentes son los gliomas, los cuales se dividen en: bajo grado, anaplásicos y glioblastomas.

El glioblastoma multiforme es el tumor cerebral más común en humanos adultos, hallándose entre las neoplasias malignas más agresivas. Este tumor es caracterizado a nivel morfológico por astrocitos neoplásicos pobremente diferenciados, con actividad mitótica, proliferación vascular y necrosis con zonas altamente hipóxicas. En la mayoría de los casos, los gliomas malignos son resistentes a la inmunoterapia, quimioterapia, radioterapia y otras terapias adyuvantes, se ha demostrado que las células de glioma pueden desarrollar resistencia a terapias que inicialmente muestran efectividad como el cisplatino y el carboplatino que son usados como quimioterapia de primera línea. Debido a esto su pronóstico es malo y se sabe que la mayoría de los pacientes mueren aproximadamente a los dos años después de haber sido diagnosticados [2].

Es por ello que se han investigado y propuesto diferentes blancos terapéuticos y agentes quimioterapéuticos contra el glioma que sean efectivos, con toxicidad reducida, efectos colaterales menores y una mejor actividad antitumoral; sustancias nuevas basadas en metales esenciales han arrojado resultados prometedores en sus fases iniciales de estudio. En los últimos años se han desarrollado complejos coordinados con cobre con efectos antineoplásicos importantes sobre el carcinoma de ovario humano, leucemia murina, hepatoma de rata y carcinomas cervicouterino y de colon. El compuesto "CuClina" Cu(1,10 Fenantrolina)(dicloro) [3] es un ejemplo de ello y en el presente trabajo se pretende demostrar su efectividad *in vitro*, así como reportar los mecanismos de muerte celular inducidos en células de glioma C6 y U87.

## ANTECEDENTES

### **¿Qué es el cáncer?**

Es definido como un conjunto de enfermedades multifactoriales de los organismos multicelulares que se caracteriza principalmente por el rápido crecimiento y/o proliferación celular que puede generar la formación de tumores y con el tiempo adquiere la capacidad de invadir otros tejidos [4]. Una característica del cáncer es la multiplicación rápida de células anormales que se extienden más allá de sus límites habituales y pueden invadir partes adyacentes del cuerpo o propagarse a otros órganos en un proceso denominado metástasis, la extensión de esta es la principal causa de muerte por la enfermedad [5].

### **Origen y factores de riesgo**

Son dos las teorías actualmente aceptadas sobre cómo es que se origina el cáncer; el primero es el modelo de evolución clonal que sugiere que el cáncer puede generarse a partir de una única célula que sufre al azar alguna alteración genética o mutación. El segundo modelo conocido como modelo de las células madre de cáncer, indica que el cáncer inicia cuando las mutaciones y alteraciones genéticas al azar se dan en un tipo específico de célula (células madre).

Existen diversos factores que intervienen en el desarrollo del cáncer; factores genéticos y agentes externos: físicos (radiaciones ultravioletas e ionizantes), químicos (humo de tabaco, arsénico) y biológicos (virus, bacterias y parásitos) [1, 5]

### **Cáncer en México**

En México, el cáncer es la tercera causa de muerte después de las enfermedades cardiovasculares y la diabetes [6]. Entre enero y agosto de 2020 se registraron 683, 823 defunciones, de las cuales 9% se deben a tumores malignos (60,421).

Durante 2017, en México de cada 100 egresos hospitalarios por cáncer en la población de 0 a 19 años de edad, 73 fueron en tejidos linfoides, seguido de tumores en el sistema nervioso con 6 egresos hospitalarios, 5 casos de tumores en hueso o cartílago y 2 en órganos digestivos. Según el Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI), la distribución porcentual por sexo indica que hay más fallecimientos en mujeres (51%) que en hombres (49%) por esta causa. El incremento en la incidencia y mortalidad por cáncer está aumentando rápidamente en todo el mundo y actualmente el cáncer ya es señalado como una causa de muerte prematura, reflejada en la calidad de vida de la sociedad [7].

### **Glioblastoma multiforme**

Los tumores astrocíticos son los gliomas derivados del tejido neuroepitelial más frecuentes e importantes, porque incluyen al glioblastoma multiforme (GBM), la neoplasia con mayor grado de malignidad entre los tumores del sistema nervioso central del adulto. El deterioro neurológico progresivo que ocasionan es determinante en la disminución de la calidad de vida de los pacientes por ser causa de dependencia y por presentar elevada mortalidad.

Clasificación y características morfológicas:

La clasificación internacional de referencia para los tumores del sistema nervioso central es la publicada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) y está basada en criterios histopatológicos [8]. Desde el punto de vista clínico se clasifica al GBM en cuatro grupos con base en su grado de malignidad [9].

- Astrocitoma pilocítico y subependimario (grado I): Tumores con borde bien definido, crecimiento lento y bajo potencial para convertirse en tumores de mayor malignidad.
- Astrocitoma difuso, pilomixoide y xantastrocitoma pleomórfico (grado II): Tumores con el borde difuso, crecimiento lento, pero pueden evolucionar a tumores de mayor malignidad.
- Astrocitoma anaplásico (grado III): A este grupo pertenecen tumores infiltrantes, con células que tienen mayor número de mitosis y son atípicas

o anaplásicas; aquellas que presentan escasa diferenciación, por lo que pueden extenderse a otros tejidos con facilidad, produciendo metástasis.

- Glioblastoma y gliosarcoma (grado IV): Engloba los tumores más malignos, caracterizados por tener un elevado crecimiento con alta tasa mitótica, pudiendo presentar gran angiogénesis y áreas de necrosis.

Es importante mencionar que la frecuencia de estos tumores varía geográficamente y no hay una edad determinada para su desarrollo, se identifican zonas de baja y alta prevalencia; los astrocitomas del adulto representan 80% de los tumores malignos del cerebro de los cuales 70% de ellos son GBM, por su parte, los tumores de grado I son más frecuentes en niños y adultos jóvenes y los de grados III y IV lo son en adultos [10].

## **Tratamiento**

Cada tipo de cáncer requiere un tratamiento concreto, algunos de los tratamientos utilizados son las intervenciones quirúrgicas, la radioterapia y la terapia sistémica (quimioterapia, tratamientos hormonales y tratamientos biológicos dirigidos). Para seleccionar la pauta terapéutica correcta se deben tener en cuenta tanto el tipo y etapa del cáncer, así como características específicas de cada paciente.

Los astrocitomas grados III y IV son de mal pronóstico y se asocian con sobrevida corta, incluso tras haber sido sometidos a tratamiento, la mitad de los pacientes fallecen al año del diagnóstico, la mayoría antes de los dos años y menos de un 5% sobrevive 5 años [8].

El tratamiento del glioblastoma está centrado en tres puntos, que siguen el siguiente orden [11]:

1. Máxima resección del tumor de manera segura.
2. Quimioterapia con agente alquilante: Temozolomida (TMZ).
3. Radioterapia adyuvante a la quimioterapia, en los casos que se requiera.



## **Cirugía**

La resección debe ser realizada correctamente, se ha demostrado que una resección mayor puede aumentar la tasa de supervivencia. Se han desarrollado nuevas tecnologías para realizar una máxima resección de la manera más segura posible tales como [12]:

- Tecnología de navegación intraoperatoria.
- Monitorización electrofisiológica y mapeo funcional del cerebro.
- Marcadores fluorescentes para maximizar la visualización del tumor.

## **Radioterapia**

La radioterapia (RT) es actualmente el tratamiento postoperatorio más efectivo en el GBM por lo que se indica, tras la cirugía, a todos los pacientes que están en condiciones de recibirla. El incremento en la media de supervivencia atribuido a la radioterapia es de 14-36 semanas [8]. Asimismo, se ha comprobado que la RT focalizada es igual de efectiva y más segura que la irradiación cerebral total. No existe acuerdo respecto al volumen terapéutico diana en GBM: la dosis total suele fraccionarse en sesiones de 2 Gy ("Gray"-unidad de medida en radioterapia que es la energía absorbida por unidad de masa) con un descanso de 2 días cada cinco de tratamiento [13].

## **Quimioterapia y radioterapia**

Estas dos modalidades de tratamiento se empezaron a combinar a partir de 2005, cuando se demostró que aumentaba la tasa de supervivencia de los pacientes. La combinación de radioterapia con un agente alquilante oral como TMZ aumenta la supervivencia en pacientes, debido a que el daño producido en el ADN por la radioterapia y la quimioterapia, puede corregirse más rápidamente. Ambas son usadas tanto antes como después de la cirugía. La administración

conjunta de RT y quimioterapia puede aumentar la incidencia de efectos adversos o acelerar su aparición debido a las propiedades radiosensibilizantes de algunos agentes quimioterápicos como la TMZ [14].

### **Terapias emergentes**

A pesar de los avances en el tratamiento del glioblastoma que se han producido en los últimos años, la supervivencia de los pacientes no ha aumentado. Actualmente las terapias son diseñadas para ser usadas en combinación con el tratamiento estándar, con el fin de mejorarlo. Ejemplo de terapias emergentes son los anticuerpos monoclonales, como el bevacizumab y la inmunoterapia innata que regenera el sistema inmune del paciente [15].

El GBM es caracterizado por su resistencia a la inmunoterapia, quimioterapia y radioterapia. Se sabe que las células de glioma son propensas a desarrollar resistencia a las terapias que inicialmente son efectivas, tales como el cisplatino y el carboplatino que son tratamientos de primera línea pertenecientes a los metalofármacos que son compuestos químicos de coordinación con un átomo central, generalmente un metal que puede o no tener un papel intrínseco en el funcionamiento del metabolismo celular, unido a ligandos que generan una respuesta biológica o citotoxicidad al interactuar con sustratos biológicos.

Debido a estas características son los medicamentos más usados contra el cáncer a nivel mundial por su facilidad de síntesis y asequibilidad, sin embargo, se sabe que muchos de ellos no solo tienen eficacia contra las células cancerígenas si no también impactan a los tejidos sanos, un ejemplo claro es la mielosupresión y nefrotoxicidad que provocan, estas características han limitado su uso y por ello se ha tenido la necesidad de investigar y proponer nuevos agentes quimioterapéuticos para este y otros tipos de cáncer [2].

Un ejemplo claro son las recientes investigaciones que involucran al Cobre, su actividad biológica y bajos efectos tóxicos, así como su noble comportamiento

químico ha abierto la posibilidad de estudiar y diseñar nuevos agentes terapéuticos antineoplásicos [3].

### **Compuestos de coordinación de cobre**

La búsqueda de agentes más amigables para el cáncer es constante a nivel mundial. México no se queda atrás en el desarrollo e investigación de agentes anticancerígenos con espectro quimioterapéutico efectivo y toxicidad reducida, investigadores mexicanos han desarrollado agentes quimioterapéuticos nombrados Casiopeinas, que son compuestos de coordinación a base de iones metálicos de cobre que han mostrado resultados prometedores con efectos antineoplásicos perceptibles sobre el carcinoma de ovario humano (CH1), la leucemia murina (L1210), el hepatoma de rata (AS-30D), los carcinomas cervicouterino (HeLa) y de colon (HCT40). Las Casiopeinas tienen actividad biológica y presentan un efecto antiproliferativo, su mecanismo de acción lo ejercen interactuando con las células cancerígenas en división durante la transición de la fase G1 a la fase S del ciclo de división celular. Otro de los blancos de las Casiopeinas son los fibroblastos que logran impedir la progresión del ciclo celular, han demostrado ser capaces de bloquear los procesos migratorios e invasivos del cáncer al inhibir la síntesis de proteínas involucradas en el ciclo celular y de igual manera presentan un efecto importante sobre el estrés oxidativo al ser buenos aceptores de electrones e interactuar con donantes de  $e^-$  como el ion superóxido ( $O_2^-$ ) y el glutatión reducido (GSH). De esta forma desempeñan un papel fundamental en la carcinogénesis al demostrar que los complejos de cobre al aceptar electrones evitan que se produzca daño oxidativo en la célula, pueden inhibir las células cancerosas al interactuar con el GSH pues el agotamiento de este puede desencadenar suicidio celular mediante apoptosis por una sobreproducción de radicales libres y por ende un incremento del estrés oxidativo [16].

Como era de esperarse existen también efectos secundarios en los compuestos de cobre, pueden ocasionar cardiotoxicidad dando lugar a fallos cardiacos cuando el fármaco entra en el citosol de los cardiomiocitos ocasionando daño

mitocondrial como consecuencia del estrés oxidativo causado por el exceso en el consumo de oxígeno por las mitocondrias [17, 18].

### **Dicloroacetato (DCA)**

El DCA (Fig. 1A) es un análogo del ácido acético al cuál se le han sustituido dos átomos de hidrógeno del grupo metilo por dos átomos de cloro [19]. Algunos autores lo identifican como un contaminante ambiental promotor de la carcinogénesis, otros le atribuyen una posible acción contra el cáncer, la acidosis láctica y algunas enfermedades raras caracterizadas por un aumento en las concentraciones de lactato que debido a su baja prevalencia es considerado un medicamento huérfano. Se obtiene a partir del ácido dicloroacético y se ha demostrado una ausencia total de efectos mutagénicos y genotóxicos en cultivos celulares destacando su potencia como quimioterapia antineoplásica con base en resultados experimentales favorables obtenidos en cultivos [20].

El ácido dicloroacético afecta el metabolismo del glutatión, un antioxidante que ayuda a proteger a las células de especies reactivas de oxígeno. Se ha observado que el DCA sódico (Fig. 1B) es un compuesto capaz de inhibir la acción de la piruvato deshidrogenasa quinasa (PDK), enzima cuya función es mantener inactiva a la piruvato deshidrogenasa (PDH), primera enzima catalítica del complejo piruvato deshidrogenasa (PDC). Al activar al PDC interviene en el tratamiento de enfermedades en las que hay una afección de la regulación de la PDK, ya que el PDC está relacionado con la fosforilación oxidativa, proceso fundamental para la obtención de ATP [21].

### **Mecanismo de acción**

El mecanismo de acción del DCA se puede resumir en la activación del PDC favoreciendo la transformación de piruvato en Acetil CoA y promoviendo así el ciclo de Krebs, lo que conlleva un aumento en el consumo total del oxígeno en la mitocondria y una disminución en las concentraciones de lactato [22].

## Farmacología

Puede ser administrado tanto por vías parenteral y oral, siendo utilizada predominantemente la vía oral. Se absorbe de manera rápida y un 20% del fármaco se une a las proteínas plasmáticas, con un aumento de la unión a estas si su administración es continua. El metabolismo del fármaco tiene dos rutas, una es la reducción a monocloraacetato (MCA) y la otra es la oxidación a glioxilato. La excreción es renal, pudiéndose identificar en orina del 1 al 2% de la dosis inicial [23].



**Fig. 1. Estructuras químicas. (A)** Estructura química del Dicloroacetato (DCA). **(B)** Estructura química del DCA-Na.

## OBJETIVOS

General:

- Estudiar el efecto anti-proliferativo, pro-apoptótico y mecanismos de acción del compuesto de coordinación de cobre (CuClina) en las líneas celulares de glioblastoma U87, LN-18 y C6 en cultivos en monocapa en condiciones de normoxia e hipoxia.

Específicos:

1. Determinar la viabilidad de los cultivos en monocapa mediante el ensayo de MTT.
2. Analizar marcadores proliferativos (PCNA), pro-apoptóticos (BAX, Caspasa 8, 9 y 3), anti-apoptóticos (BCL-2, BCLxL) por la técnica de Western blot.
3. Determinar la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) por fluorometría empleando la sonda DCFDA y Mito-Sox-Red en los cultivos controles y tratados con el fármaco, así como la participación de las ROS

mediante el uso del antioxidante general N-acetil cisteína.

4. Comprobar el efecto antimigratorio de CuClina en los cultivos en monocapa en todas las concentraciones de trabajo.
5. Determinar de los niveles de expresión de proteínas que forman y regulan a HIF-1 (PDH 1,-2,-3, HIF-1 $\alpha$ , HIF-1 $\beta$ ,  $\alpha$ -actina, Lamina B) por la técnica de Western blot e inmunohistoquímica.
6. Analizar la regulación y participación de HIF-1 en el efecto antineoplásico de CuClina en los cultivos en monocapa mediante el uso de inhibidores farmacológicos de HIF- 1 $\alpha$ .

#### METODOLOGÍA.

Diseño de estudio: Estudio experimental, analítico y prospectivo.

- **Cultivos celulares en monocapa**

U87 y LN-18 (glioma humano) y C6 (glioma de rata), obtenidas de American Tissue Culture Collection (ATCC) fueron cultivadas en cajas de 75 cm<sup>2</sup> en medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) y 10.000 unidades/mL de penicilina/estreptomicina. Las condiciones de incubación fueron 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de O<sub>2</sub> en condiciones estériles. Se realizaron uno o dos cambios de medio por semana hasta alcanzar el 90-95% de confluencia aproximadamente al día 6 de cultivo.

Tratamientos y Ensayo de proliferación celular: Se formaron grupos de cultivos de las líneas celulares: grupos tratados con 0.75, 1.0, 1.5 y 2.5  $\mu$ g/mL de CuClina disuelta en agua desionizada estéril con y sin NAC (20 Mm). Los grupos control no fueron tratados. El tiempo de incubación de todos los experimentos fue de 24 horas. Todos los grupos se mantuvieron bajo las condiciones mencionadas previamente.

La proliferación celular fue determinada por el ensayo calorimétrico usando MTT. Las células fueron sembradas en placas de microtitulación de 96 pozos a una densidad de  $2 \times 10^5$  por pocillo en medio DMEM. Después de 24 horas, las células se trataron con el fármaco a las concentraciones antes descritas, las células no

tratadas sirvieron como control. Después del tratamiento durante 24 horas, se analizó la viabilidad celular evaluando la densidad óptica de las células controles y tratadas utilizando bromuro de 3[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazolio (MTT; Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania).

- **Determinación de marcadores proliferativos y apoptóticos por la técnica de Western Blot**

Los cultivos controles y tratados se procesaron mediante el Cell Lysis-M buffer (Sigma) e inhibidores de proteasas (10 mg/mL leupeptina, 1.0µg/mL aprotinina y 0.1mM PMSF) para la obtención del lisado celular. También se obtuvieron las fracciones citosólicas y nucleares de los cultivos mediante el Kit de Extracción Nuclear y Citoplásmica NE- PER®. Posteriormente la concentración de proteínas se realizó por el método de Lowry. Por la técnica de Western blot se analizaron los niveles de expresión de las proteínas PCNA, Bcl-2, BCLxL, BAX, activación de caspasas 3,-8,-9 y  $\beta$ -actina en los lisados celulares y PDH 1,2,3, HIF-1 $\beta$ , HIF-1 $\alpha$ ,  $\beta$ -actina y Lamina B en los extractos nucleares y citosólicos. Las proteínas se separaron en geles SDS/PAGE y transfirieron a membranas de nitrocelulosa.

Se incubaron las membranas con los anticuerpos primarios específicos toda la noche a 4°C, posteriormente se incubaron con anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa. Se revelaron por quimioluminiscencia y se cuantificó la intensidad de las bandas (Densitómetro computarizado de Molecular Dynamics, software ImageQuant versión3.2.2).

- **Técnica de TUNEL**

Para la técnica de TUNEL, las células controles y tratadas se cultivaron en una cámara de vidrio en placas de 8 pozos. Se efectuó con el Kit de Detección de Muerte Celular *in situ* (Cell Death Detection Kit, AP, Roche Diagnostics). Fueron fijadas con paraformaldehído al 3.7% en PBS 1X por 1 hora a 4°C, posteriormente se lavaron 3 veces con PBS y se permeabilizaron con solución de recuperación (citrate de sodio 0.1M pH 6) por 30 minutos a 100°C. Posteriormente se incubaron con la mezcla reactiva TUNEL (transferasa

deoxinucléotido del timo de becerro y una mezcla de nucleótidos acoplados a FITC) a 37°C por 1 hora. Posteriormente, las laminillas se lavaron 2 veces con PBS y se agregó medio de montaje con DAPI. Las laminillas se observaron con un microscopio confocal de barrido láser invertido Zeiss LSM510 (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemania).

#### • **Determinación de las especies reactivas de oxígeno**

Se usó la sonda DCFH-DA (diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína), es una molécula estable, no fluorescente, que se hidroliza por esterasas a DCFH no fluorescente, el cual es oxidado en presencia de ROS (anión superóxido, peróxido de hidrógeno y radical hidroxilo) convirtiéndose en 2,7-DCF altamente fluorescente. Las células lisadas fueron diluidas a 1:10 con 40mM Tris (pH7.4) y 5µM DCFH-DA en metanol a 37°C. La fluorescencia se registró después de 3, 6 y 24 horas de incubación. La formación del derivado oxidado fluorescente de DCFH, denominado DCF, se controló a una longitud de onda de excitación de 525 nm. La fluorescencia se registró empleando un microscopio tipo ZOE Fluorescent Cell Imager de BIO-RAD®.

#### • **Análisis estadístico**

Todos los estudios *in vitro* se realizaron por triplicado. Los datos de los experimentos se analizaron mediante ANOVA de una vía seguido de la prueba de comparación múltiple de Tukey. Valor de <0,05 se consideró significativo.

### ACTIVIDADES REALIZADAS

#### • **Cultivos celulares en monocapa**

Los modelos de estudio fueron las línea celulares U87 de glioma humano y células C6 de glioma de rata, obtenidas de American Tissue Culture Collection (ATCC). Los cuales fueron cultivados en cajas de 75 cm<sup>2</sup> en medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) y 10000 unidades/mL de penicilina/estreptomicina, mantenidas en



una atmosfera húmeda de 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de O<sub>2</sub> (normoxia) a 37°C. Cuando los cultivos alcanzaron un 60-80% de confluencia se lavaron con solución salina estéril (NaCl) suplementada con 10000 unidades/mL de penicilina/estreptomicina y se les adicionó medio fresco. Posteriormente las células se incubaron a las condiciones mencionadas anteriormente realizando cambio de medio cada 2-3 días aproximadamente o cuando el color del medio se tornará naranja/amarillento. Cuando la monocapa en las cajas de cultivo alcanzó un 100% de confluencia, se desechó el medio, se lavó con solución salina y se adicionó 1mL de tripsina estéril al 1% y se mantuvo por 3-5 minutos hasta que las células se desprendieran totalmente. La suspensión celular se centrifugó a 3000 rpm durante 5 minutos, el pellet se disolvió en 1mL de medio de cultivo y se cuantificaron las células en cámara de Neubauer, una vez realizada la cuantificación se hicieron los cálculos necesarios para sembrar el número de células necesarias de acuerdo a las pruebas a realizar.

*Tratamientos:* Se formaron grupos de cultivos de las líneas celulares U87 y C6 de glioma humano y rata respectivamente. Grupos tratados con concentraciones de 0.75, 1.0, 1.5 y 2.5 µg/mL de CuClina disuelta en agua desionizada estéril, grupos de las mismas concentraciones con N-acetil cisteína (NAC) 20Mm y Glutación reducido (GSH) 20Mm para analizar el efecto antioxidante de estos en las células de glioma. Los grupos control no fueron tratados, únicamente se les añadió medio de cultivo nuevo. El tiempo de incubación de todos los experimentos fue de 24 horas. Todos los grupos se mantuvieron bajo las condiciones mencionadas previamente.

*Ensayo de proliferación celular:* La proliferación celular fue determinada por el ensayo calorimétrico usando MTT de acuerdo a Mosmann et al; 1983. Las células fueron sembradas en placas de microtitulación de 96 pozos a una densidad de  $2 \times 10^5$  por pocillo en medio DMEM. Después de 24 horas, las células se trataron con el fármaco a las concentraciones antes descritas, las células no tratadas sirvieron como control. Después del tratamiento durante 24 horas, se

analizó la viabilidad celular evaluando la densidad óptica de las células controles y tratadas utilizando bromuro de 3[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazolio (MTT; Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania).

*Tratamientos en cajas de 75cm<sup>2</sup>:* Al tener una confluencia celular del 100% en cada una de las cajas, se lavaron con NaCl y se les añadieron 10mL de medio de cultivo DMEM con la dosis correspondiente de CuClina para cada concentración, se dejaron incubando por 24 horas a las condiciones mencionadas y al día siguiente se observó el efecto del fármaco sobre las células.

*Recuperación de tratamientos con scraper:* Una vez pasadas las 24 horas de tratamiento en las cajas de 75cm<sup>2</sup> se procedió a raspar la monocapa con un scraper, tomando en cuenta que el orden de recuperación fuera creciente (empezando por el control hasta la concentración más alta), la suspensión celular se recuperó por separado, se centrifugaron a 3000 rpm por 5 minutos, se desechó el sobrenadante y el pellet se conservó a -20°C para su uso posterior.

\*\*Las cajas recuperadas se desechan según los protocolos establecidos y a la caja etiquetada como control se le añade medio nuevo y se incuba.

- **Determinación de marcadores proliferativos y apoptóticos por la técnica de Western blot**

Por la técnica de Western blot se analizaron los niveles de expresión de las proteínas PCNA, Bcl-2, BCL-xL, BAX, activación de caspasas 3, 8, 9 y  $\beta$ -actina en los lisados celulares y PDH 1,2,3, HIF-1 $\beta$ , HIF-1 $\alpha$  y  $\beta$ -actina en los extractos nucleares y citosólicos. Las proteínas se separaron en geles SDS/PAGE y transfirieron a membranas de nitrocelulosa.

*Lisis celular:* Los cultivos controles y tratados recuperados se procesaron mediante el Cell Lysis-M buffer (Sigma) e inhibidores de proteasas (10 mg/mL

leupeptina, 1.0µg/mL aprotinina y 0.1mM PMSF) para la obtención del lisado celular. También se obtuvieron las fracciones citosólicas y nucleares de los cultivos mediante el Kit de Extracción Nuclear y Citoplásmica NE- PER®. Primero se descongelaron los pellets obtenidos y se homogenizaron, se les agregaron 350µL de buffer de lisis, se disolvió correctamente y las muestras se mantuvieron en agitación por 1 hora a 4°C, al pasar el tiempo de agitación las muestras se centrifugaron a 9000 rpm durante 10 minutos, posteriormente se recuperó el sobrenadante y se continuo con la cuantificación de proteínas.

*Cuantificación de proteínas:* La concentración de proteínas se realizó por el método de Lowry. En tubos de vidrio se colocaron 1mL de agua destilada, 2mL de reactivo A (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 2% en NaOH 0.1M, KNaC<sub>4</sub>H<sub>4</sub>O<sub>6</sub>·4H<sub>2</sub>O (tartrato de sodio y potasio o sal de Seignette) al 1% y CuSO<sub>4</sub> al 1%) y 10µL de cada lisado correspondiente a su tubo y 100µL de folin (mezcla de fosfomolibdato y fosfowolframato, usado para la determinación de antioxidantes fenólicos y polifenólicos). Las muestras se dejaron reposar 15 minutos a temperatura ambiente para después leerlas en el espectrofotómetro a una λ560nm.

*Preparación de geles de poliacrilamida:* Se pesaron los reactivos necesarios para la preparación de las soluciones que conforman el gel: Mix acrilamida/bisacrilamida, tris base pH 8.8, tris base pH 6.8, SDS al 10%, persulfato de amonio y temed al igual que el buffer de corrida y transferencia respectivamente. Los geles se prepararon a una concentración del 12% mezclando los reactivos en las proporciones establecidas para 10mL destinados al gel y 2mL para los pozos. Se montó previamente el soporte con los cristales, primero se colocó la preparación del gel y una vez gelificado se continuo con los pozos, al solidificar, se retiró el peine y se desmontaron los cristales del soporte conservándose húmedos hasta que fueron usados en la corrida de las muestras.

*Preparación de las muestras para correr el gel:* Se descongelaron los lisados y se agregaron 40µL en tubos Eppendorf de 1.5mL etiquetados con las concentraciones correspondientes, posteriormente se añadieron 10µL de buffer de carga\*. Las muestras se sometieron a desnaturalización en baño maría a

100°C por 8 minutos y una vez pasado el tiempo se centrifugaron a 9000 rpm durante 5 minutos. Al finalizar este proceso las muestras se conservaron a temperatura ambiente mientras se montó la cámara de electroforesis. \*Las muestras se mantuvieron en hielo durante el proceso.

*Montaje de la cámara de electroforesis y corrida de muestras:* Los geles se colocaron en los soportes de la cámara y se rellenó con buffer de corrida hasta la marca, se cargaron las muestras en los pozos con el marcador de peso molecular (Precision plus protein standards BIO-RAD®) al centro del gel. Una vez cargadas todas las muestras, se cerró la cámara conectando correctamente los electrodos a la fuente de alimentación programada a 130Mv por 2 horas o hasta que el frente azul que son las proteínas llegara a la parte inferior del gel, una vez pasado el tiempo el equipo se apagó y los geles se retiraron de la cámara.

*Transferencia de geles:* Partiendo de los geles obtenidos en la corrida ya desmontados de los cristales se montó el “sandwich” con el color negro del soporte como base, trabajando bajo buffer de transferencia para que los componentes permanecieran húmedos, los componentes que conforman el sándwich son: Esponja, papel filtro Whatman grueso, gel, membrana de nitrocelulosa, papel filtro Whatman grueso, esponja. Una vez montado se metió en la cámara de transferencia con el color negro de sándwich orientado hacia el polo negro de la cámara de transferencia llena de buffer, se tapó y conectó a la cámara de poder ajustada a 0.20 AMPS durante dos horas. Al cumplirse el tiempo se desmontó el equipo y las membranas se tiñeron con rojo de Ponceau para verificar que la transferencia se hubiese dado exitosamente, una vez comprobado se retiró el colorante dejando la membrana con agua en agitación por 10 minutos aproximadamente.

### *Western blot*

*Bloqueo:* Se preparó la solución de bloqueo necesaria que consta de 1.25g de leche en polvo disuelta en 25mL de PBS por membrana, se colocó cada membrana en un recipiente con la solución y se dejó en agitación durante 2 horas a temperatura ambiente.

### *Detección.*

*Anticuerpo primario:* Se preparó una solución con cantidades iguales de leche líquida baja en grasa y solución de anticuerpo (PBS, albúmina y Tween 20) a la cual se le agregó una cantidad muy pequeña de anticuerpo primario que iba desde 0.5 a 5 $\mu$ L/mL dependiendo del fabricante y de la efectividad de dicho anticuerpo. Pasadas las dos horas de bloqueo, se tomó la membrana, se le retiró el exceso de solución de bloqueo y se selló en plástico grueso junto con la solución de anticuerpo 1° preparada anteriormente, se dejó incubando en agitación a 4°C durante toda la noche.

*Lavado de anticuerpo primario:* A la mañana siguiente se retiró la membrana de la solución de anticuerpo y se le hicieron 3 lavados de 10 minutos cada uno en agitación con PBS tritón para eliminar el anticuerpo primario que no logró unirse a la proteína deseada durante la incubación.

*Anticuerpo secundario:* Tras lavar la membrana, se expuso al anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa. Se preparó la solución de igual forma que la de anticuerpo primario; con cantidades iguales de leche líquida baja en grasa y solución de anticuerpo, más la cantidad indicada de anticuerpo secundario. Se selló la membrana en plástico grueso y se dejó incubando por una hora en agitación a temperatura ambiente.

*Lavado de anticuerpo secundario:* Para lavar la membrana y dejarla limpia del anticuerpo secundario, se lavó tres veces por 10 minutos con PBS tritón en agitación. Una vez terminados los lavados se empaquetó la membrana en plástico delgado y se hizo un corte en uno de los extremos.

*Análisis quimioluminiscente:* Una vez lista la membrana, se llevó a revelar en un cuarto oscuro que permitió observar la luminiscencia. Se usó el kit de revelado hipersensible de Santa Cruz Biotechnology; se preparó una mezcla de 500µL de solución A (Luminol Enhancer solution) y 500µL de solución B (Peroxide Solution) que se añadió a la membrana sellada en el plástico delgado, al notar bandas fluorescentes se retiró de inmediato y se colocó dentro del cartucho de revelado con un film sobre la membrana, el cartucho se cerró y se dejó 5 segundos para que la señal se transfiriera de la membrana al film, pasados los 5 segundos se sacó el film y se sumergió en solución reveladora, se esperó el tiempo necesario para que las bandas se percibieran y enseguida se sumergió en solución fijadora, los films se dejaron secar y se analizaron los resultados obtenidos y las bandas correspondientes a la proteína buscada.

*Desnudo de membrana:* Independientemente de haber obtenido resultados o no en el revelado de la membrana, se procedió a realizar el desnudo de la misma con solución de desnudo (NaOH 0.2M) por 10 minutos en agitación, posteriormente se usó colorante rojo de Ponceau para verificar la presencia de proteínas en la membrana, una vez confirmado se lavó con abundante agua para retirar restos del colorante y se selló en plástico grueso, de lo contrario al no haber proteínas la membrana se desechó.

*Revelado con  $\beta$ -actina:* Se siguieron los mismos pasos anteriores. La diferencia es que al incubar con el anticuerpo primario se colocó  $\beta$ -actina y como anticuerpo secundario se utilizó anti-Mouse, los lavados y el revelado de la misma se efectuaron de la misma manera que lo ya descrito anteriormente.

- **Ensayo de TUNEL**

*Fijación y permeabilización:* Se cultivaron células en cámaras de vidrio de 8 pozos, cuando la monocapa estuvo llena se trataron las cámaras con las concentraciones establecidas y su respectivo control (0.75, 1.0, 1.5 y 2.5 µg/mL de CuClina disuelta en agua desionizada estéril). Las células en controles y tratadas fueron lavadas 2 veces con PBS y fijadas con paraformaldehído al 3.7 % en PBS por 1 hora a 4°C, posteriormente se lavaron con PBS y se

permeabilizaron con solución de recuperación antigénica por 30 min a 100°C en un vaso tipo coplin, pasado el tiempo se desechó la solución de recuperación y se lavó con agua corriente para volver a rellenar el coplin con PBS y conservarlas.

*Preparación y lectura:* Para poder visualizar las muestras ya fijadas y permeabilizadas se prepararon con el kit para ensayo de túnel; trabajando en hielo, se desecharon 100µL del vial que contenía el buffer, y se agregó toda la enzima al vial al que se le retiró el volumen previamente. A la cámara con las células fijadas se le delimitó el contorno con una pluma hidrofóbica y posteriormente se agregó la mezcla preparada, se incubaron en una cámara húmeda a 37°C por 1 hora. Al haberse cumplido el tiempo las muestras se enjuagaron con PBS en coplin y en un ambiente sin luz se agregó una gota del medio de montaje para fluorescencia, se colocó un cubre objeto haciendo que por capilaridad se cubriera toda la placa con el medio de montaje, posteriormente se selló el contorno con esmalte transparente y se conservó a 4°C por 24 horas cubiertos con papel aluminio. Las laminillas fueron observadas y fotografiadas en un microscopio confocal Zeiss LSM510 (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemania).

- **Determinación de las especies reactivas de oxígeno.**

Se destinaron 3 placas para el ensayo, cada una fue analizada a diferentes tiempos, 3, 6 y 24 horas luego de ser tratadas.

Se cultivaron células en cámaras de vidrio de 8 pozos, cuando la monocapa estuvo llena se trataron las cámaras con las concentraciones establecidas y su respectivo control (0.75, 1.0, 1.5 y 2.5 µg/mL de CuClina disuelta en agua desionizada estéril) a los tiempos previamente establecidos para el estudio, es decir, para el análisis a las 6 y 24 horas, las células se trataron a las 7 am, para el análisis de 3 horas se trataron a las 10 de la mañana para que tanto las de 3 como las de 6 horas salieran al mismo tiempo, es decir a la 1 de la tarde y las de 24 a las 7am del día siguiente. Al haberse cumplido dichos tiempos se realizaron dos lavados pozo por pozo con medio de cultivo DMEM sin suplementar y enseguida se agregaron las sondas de interés; Mito-Sox-Red a una concentración de trabajo

de 5 $\mu$ M y DCFH-DA (Diclorofluorescein diacetato) a una concentración de trabajo de 10  $\mu$ M con señal roja y verde respectivamente. Se incubaron las placas con las sondas por 10 minutos para la sonda roja y 40 para la sonda verde a 37°C y pasado el tiempo se lavaron 2 veces con el medio sin suplementar para ser observadas y fotografiadas en un microscopio tipo ZOE Fluorescent Cell Imager de BIO-RAD®.

#### •Ensayo de Migración

Para este ensayo se utilizaron cajas de cultivo de 6 pozos sembrando un millón de células en cada uno de los pozos. Cuando la monocapa estuvo completamente llena se hizo una incisión o “herida” de forma vertical al centro de cada pozo con una punta de micropipeta, luego de realizar la incisión se hizo un lavado con medio de cultivo, se tomaron fotografías y posteriormente se trató con las concentraciones establecidas y su respectivo control (0.75, 1.0, 1.5 y 2.5  $\mu$ g/mL de CuClina disuelta en agua desionizada estéril) y se dejó incubando por 24 horas. Al día siguiente se observó la placa en el microscopio y se analizó la presencia o no de células sobre la herida realizada en cada concentración, se tomaron fotografías, se compararon con las del día anterior pre tratamiento y se reportaron los resultados.

#### METAS ALCANZADAS

- Luego de ensayo y error, se determinaron las concentraciones más viables del fármaco que permitieron llevar a cabo los protocolos planeados y obtener así resultados significativos, se descartaron las concentraciones más bajas y las más altas debido a la eficacia del tratamiento.
- Se logró determinar la eficacia de los antioxidantes NAC y GSH en los tratamientos en monocapa para las líneas celulares C6 con CuClina.
- En la determinación de especies reactivas de oxígeno se tuvieron que modificar los tiempos de análisis a periodos cortos y largos para ir monitoreando el daño celular una vez sometidos los cultivos al tratamiento,



logrando así resultados favorables para la sonda roja en la línea celular U87 de glioblastoma humano.

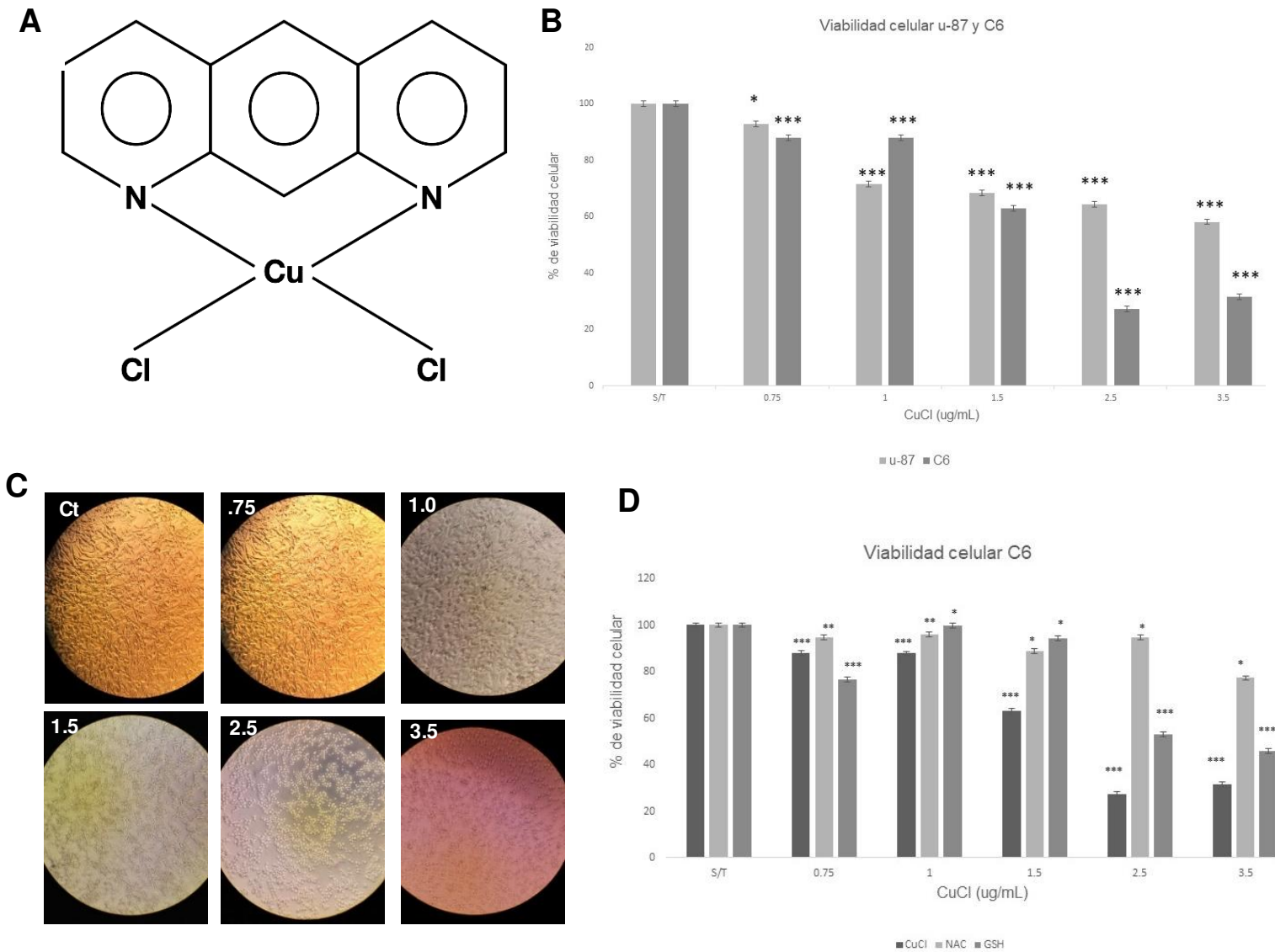
- Se pudo apreciar que el compuesto CuClina si ejerce un efecto anti migratorio, luego del análisis de los resultados en el ensayo de migración en el que se analizaron todas las concentraciones de trabajo.

## RESULTADOS Y CONCLUSIONES

La CuClina inhibió la viabilidad celular en tratamientos de varias líneas de glioma humano y de rata. Para conocer el efecto de la CuClina (Fig. 2A) sobre las líneas celulares y determinar la viabilidad en controles y tratados después de 24 horas de someterse al tratamiento se realizó un ensayo MTT, donde se rescata que el efecto del compuesto es dosis dependiente, pues se observó una disminución en la viabilidad celular (Fig. 2B). En concentraciones bajas, el daño que se observa en la monocapa es menor a comparación de las dosis más altas. Las células tratadas sufrieron cambios en su morfología (Fig. 3B), en dosis menores el crecimiento se detuvo y la forma alargada característica comenzó a disminuir su tamaño, en dosis mayores como 1 y 1.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  las células se contrajeron y redondearon llegando a desprenderse de la base del pozo de la caja de cultivo disminuyendo notoriamente su cantidad en la monocapa, en 2.5 y 3.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  las células se visualizaron totalmente muertas después de las 24 horas de tratamiento. Aquellas células no tratadas en los controles permanecieron morfológicamente sin cambios.

La aparición del formazano de MTT en controles y en dosis bajas es notorio mediante la coloración violeta que indica la reducción del compuesto de MTT únicamente bajo la actividad de células vivas (Anexo 1), a dosis mayores la coloración amarillenta indica la presencia de daño celular, pues las deshidrogenasas mitocondriales no logran reducir al compuesto de MTT por lo que la coloración morada no se hace presente. Los resultados obtenidos de las absorbancias arrojan un porcentaje de viabilidad celular mayor en la línea celular

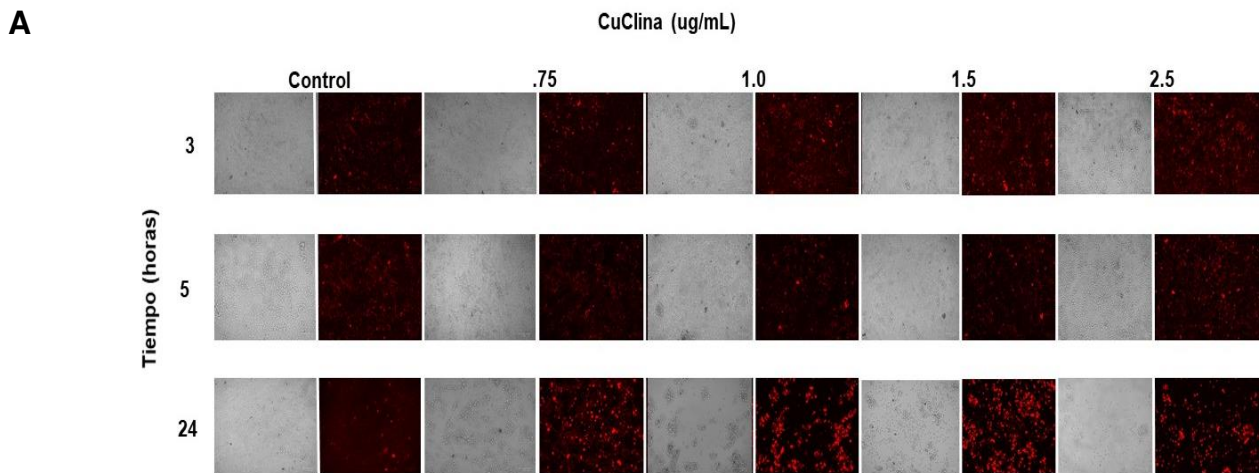
U87, lo que quiere decir que esta línea es más resistente al tratamiento con el compuesto CuCl que la línea C6 de rata. Se concluye entonces que la viabilidad obtenida en ambas líneas representa una reducción significativa, deduciendo así que el compuesto si ejerce un daño en las células al menos 24 horas después del tratamiento.



**Fig. 2. Ensayo de viabilidad celular.** (A) Estructura química de la “CuClina” [Cu(1,10 Fenantrolina)(dicloro)]. (B) Grafico que demuestra la viabilidad celular de ambas líneas celulares; U87 y C6 a las 24 horas de someterse al tratamiento con CuClina. (C) Microscopia de controles y concentraciones de trabajo de los tratamientos con CuClina donde se muestra la morfología de las células después de las 24 horas. (D) Grafico de viabilidad celular con línea C6 con tratamiento CuCl, CuCl + NAC y CuCl + GSH después de 24 horas. Cada barra representa la media ± DE (P < 0,05, \*\*P < 0,01, \*\*\*P < 0,001).

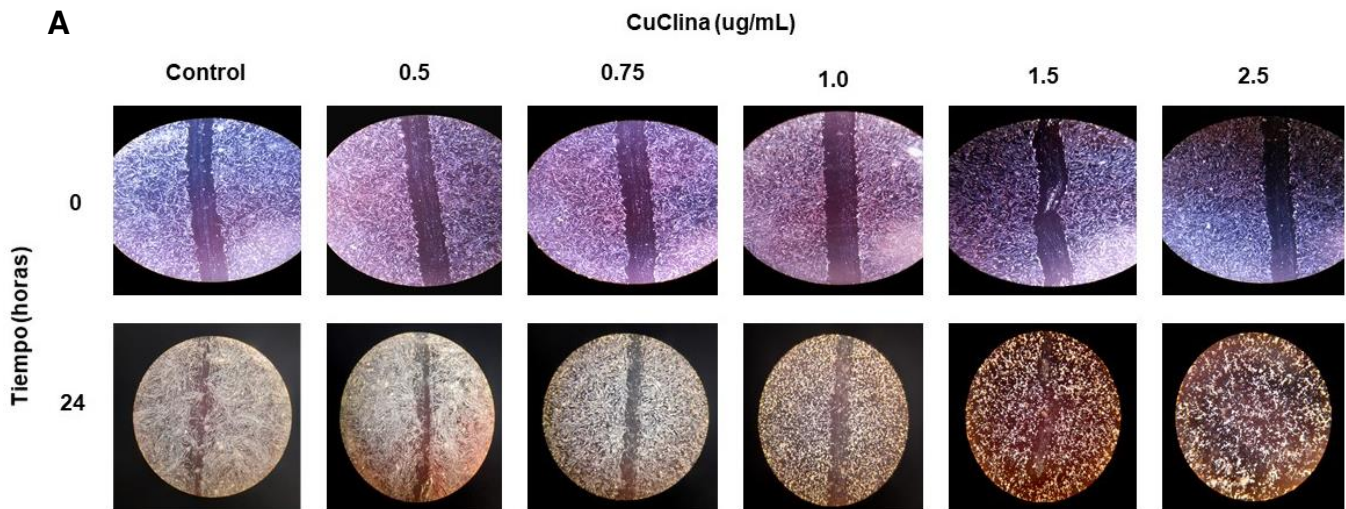
En el ensayo de viabilidad celular con CuCl<sub>2</sub> añadiendo NAC y GSH, potentes antioxidantes que permiten reducir el estrés oxidativo en las células una vez que se tratan con el compuesto, los resultados obtenidos en esta prueba (Fig. 2D) indican que el tratamiento al que se le agregó NAC presentó un importante incremento en la viabilidad celular después de las 24 horas incluso en dosis altas, se concluye entonces que el NAC ejerce un efecto antioxidante significativo al bloquear la acción de las especies reactivas que se originan cuando el estrés oxidativo aumenta debido al daño celular. Por otra parte, en el tratamiento con GSH se aprecian fluctuaciones en la viabilidad celular en las distintas concentraciones, incluso en dosis altas la viabilidad disminuyó considerablemente, cosa que no sucedió con los resultados obtenidos con NAC. Sin embargo, en ambos casos la viabilidad celular se ve beneficiada comparada con los casos en donde no se añade un antioxidante y se trata únicamente con el compuesto CuCl<sub>2</sub>.

Para que la CuCl<sub>2</sub> ejerza su efecto antineoplásico es fundamental la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS). Se evaluó la producción de dichas especies, principalmente aquellas derivadas del ion superóxido con el propósito de determinar la vía de generación de estas. Se analizaron los controles y tratamientos con sonda roja (Mito-Sox-Red) para células U87 tratadas con CuCl<sub>2</sub> a 3 diferentes tiempos (3,5 y 24 horas). A las 3 horas no se percibieron señales significativas en los tratamientos, mucho menos en los controles, incluso en las concentraciones altas como 1.5 µg/mL, 5 horas después del tratamiento las señales bajo el microscopio comenzaban a notarse más, indicativo a que las células comenzaban a presentar daño inducido por el compuesto, 24 horas más tarde, las señales percibidas ocupaban un área mucho mayor, el daño en la célula fue notorio e incluso se comenzaban a desprender, disminuyendo el número de células presentes en la mono capa.



**Fig. 3. Especies reactivas de Oxígeno. (A)** A medida que pasa el tiempo después de someter las células al tratamiento se aprecian más señales rojas, indicativo de daño celular en la mitocondria, que se perciben gracias a la sonda Mito-Sox-Red. En los controles no se perciben señales, en dosis altas como 1.5 y 2.5  $\mu\text{g/mL}$  las señales se intensifican proporcional a un daño celular mayor.

Para comprobar si el compuesto CuClina ejerce un efecto antimigratorio en células U87 *in vitro*, se analizó la capacidad de migración mediante dicho ensayo, esperando que la herida hecha al centro del pozo en cada una de las concentraciones no se rellenara después de las 24 horas de haber realizado el ensayo, los resultados demuestran que la migración en controles y en la concentración .5 en donde la viabilidad celular no se ve afectada se disminuye la cantidad de células que migran a la herida manteniendo su morfología normal, en las concentraciones establecidas en los tratamientos la inhibición es notoria en .75 y 1.0, en 1.5 y 2.5  $\mu\text{g/mL}$  la herida queda casi imperceptible por que las células han ocupado el espacio con un cambio notorio en su morfología debido al efecto del tratamiento sobre ellas tal como se muestra en la Fig. 4A.



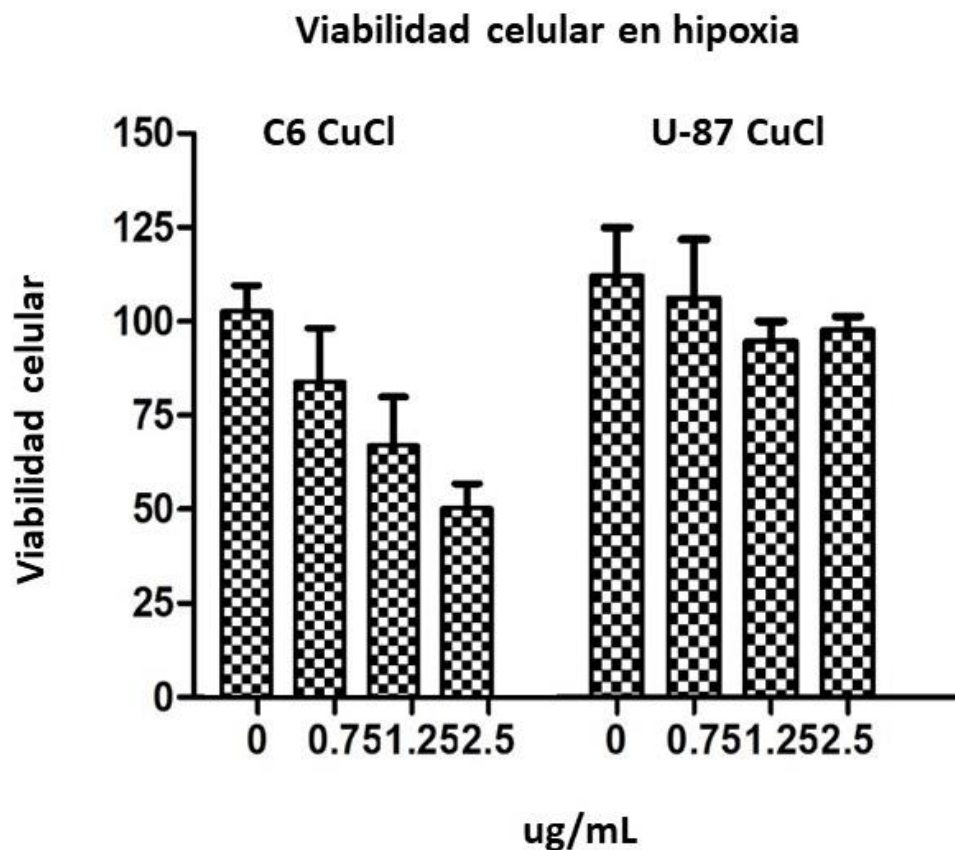
**Fig. 4 Ensayo de migración en células de glioblastoma humano (u-87).** (A) La migración celular se determinó mediante la cicatrización de heridas en células u-87 no tratadas (controles) y células tratadas con CuClina durante 24 horas. Las microfotografías son representativas de al menos tres experimentos diferentes para cada condición experimental.

Se sabe que las células tumorales han desarrollado estrategias para adaptarse al microambiente hipóxico. Al analizar la viabilidad celular bajo estas condiciones se observó que en células U87 tratadas con CuClina no se ve afectado el rendimiento del compuesto por los niveles reducidos de oxígeno, el número de células viables en las distintas concentraciones es alto sin variaciones específicas comparado con lo obtenido en las células de glioma de rata C6, las cuales presentaron un comportamiento distinto, la viabilidad celular disminuye de forma proporcional a la concentración, es decir a mayor concentración de CuClina la viabilidad celular fue menor.

Se puede concluir entonces que el efecto de la CuClina no se ve afectado por los niveles de oxígeno del medio pues la bajada de la viabilidad no es significativa, mostrando mejores desempeños en la línea celular U87. El efecto esperado de nuestro compuesto continúa independientemente de las condiciones, la explicación es la activación de HIF (factor inductor de hipoxia) en células tumorales cuando la homeostasis celular se ve alterada frente a niveles bajos de oxígeno. La activación de HIF cumple un papel fundamental en la respuesta frente a hipoxia, ya que regula la expresión de genes, cuyos productos son proteínas que participan en procesos como la angiogénesis, el metabolismo energético, la

eritropoyesis, la remodelación vascular y la proliferación celular, de igual forma HIF es capaz de atenuar la respiración mitocondrial y la generación de ROS a través de la cadena de transporte de electrones. HIF induce la expresión de NDUFA4L2 por sus siglas en inglés, (NADH Dehydrogenase (ubiquinona) 1 alpha subcomplex 4-Like 2), el cual inhibe la actividad de la cadena de transporte de electrones en el Complejo I, atenuando el consumo y la producción de ROS.

**A**



**Fig. 4 Viabilidad celular bajo condiciones de hipoxia. (A)** En la gráfica se muestran ambas líneas celulares con las que se trabajó, se sometieron a tratamiento con CuCl por 24 horas en sus distintas concentraciones y control y se determinó la viabilidad celular tras permanecer en condiciones de hipoxia

## RECOMENDACIONES

Profundizar en la investigación para conocer de manera certera la vía por la que se da la apoptosis; si es mediante vía mitocondrial o por receptores de muerte. Al conocer esta información se tendrá una idea más clara de la formación de las especies reactivas de oxígeno.

## CONCLUSION GENERAL

El estudio de los compuestos de cobre como agentes antineoplásicos apenas inicia, se desconoce aún sus efectos a largo plazo y de cómo estos interactúan con las diferentes rutas metabólicas de los sistemas biológicos, sin embargo son una buena alternativa entre los tratamientos quimioterapéuticos y los efectos colaterales que en muchos de los casos terminan dañando tejidos y órganos sanos de los pacientes. Considero necesario que la sociedad esté al tanto de los avances que se generan en la ciencia y como estos permiten mejoras en nuestra calidad de vida.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Contreras, L. E. (2017). EPIDEMIOLOGÍA DE TUMORES CEREBRALES. Revista Médica Clínica Las Condes. <https://www.elsevier.es/es-revista-revista-medica-clinica-las-condes-202-articulo-epidemiologia-de-tumores-cerebrales-S0716864017300585>
2. Castañeda, C A, et al., (2015). Glioblastoma: Análisis molecular y sus implicancias clínicas. Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica, 32(2), 316-325  
[http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S172646342015000200017&lng=es&tlng=es](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S172646342015000200017&lng=es&tlng=es)
3. Trejo-Solís, C. (2012). Copper compound induces autophagy and apoptosis of glioma cells by reactive oxygen species and jnk activation - BMC Cancer. BioMed Central. <https://bmccancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2407-12-156>
4. Boddy, A. M, et al., (2015). Susceptibilidad al cáncer y compensaciones reproductivas: un modelo de la evolución de las defensas contra el cáncer. Transacciones filosóficas de la Royal Society B: Ciencias biológicas , 370 (1673), 20140220.
5. Cáncer. (2022). <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer>
6. Parkin D. M, et al., (2002). Estadísticas mundiales del cáncer; 55 : 74 - 108 .
7. ESTADÍSTICAS A PROPÓSITO DEL DÍA MUNDIAL CONTRA EL CÁNCER. (2021).  
<https://www.inegi.org.mx>. [https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/aproposito/2021/cancer2021\\_Nal.pdf](https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/aproposito/2021/cancer2021_Nal.pdf)
8. Grossman, S. A., & Batará, J. F. (2004). Current management of glioblastoma multiforme. Seminars in oncology, 31(5), 635–644.  
<https://doi.org/10.1053/j.seminoncol.2004.07.005>
9. Louis et al., (2016). The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. Acta neuropathologica, 131(6), 803–820. <https://doi.org/10.1007/s00401-016-1545-1>
10. Aguirre-Cruz, et al. (2020). Epidemiología descriptiva y cambios en la frecuencia de tumores astrocíticos en el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía de México. Salud Pública De México, 62(3, may-jun), 255-261.  
<https://doi.org/10.21149/10680>
11. Garrido Díaz, N. (2021). Nanomedicinas para el diagnóstico y tratamiento del glioblastoma.
12. Chiocca, E. A, et al., (2019). Terapia génica de interleucina-12 regulable en pacientes con glioma de alto grado recurrente: resultados de un ensayo de fase 1. Ciencia medicina traslacional.



13. Shapiro, R. & Vallee, BL (1989). Mutagénesis dirigida al sitio de histidina-13 e histidina-114 de angiogenina humana. Los derivados de alanina inhiben la angiogénesis inducida por angiogenina. *Bioquímica*, 28 (18), 7401-7408.
14. Chamberlain, M. C, et al., (2007). Necrosis temprana después de Temodar y radioterapia concurrentes en pacientes con glioblastoma. *Revista de neurooncología* , 82 (1), 81-83.
15. Carlsson, SK, (2014). Nuevas estrategias de tratamiento para el glioblastoma multiforme. *Medicina molecular EMBO* 6 (11), 1359-1370
16. Avelar, M. (2012). ¿Las Casiopeinas® Previenen la Enfermedad del Cáncer Actuando como Antirradicales? Un estudio de reactividad química aplicando la teoría del funcional de la densidad. *Revista de la Sociedad Química Mexicana* , 56 (3), 250-256. Recuperado en 01 de diciembre de 2022, de [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1870-249X2012000300004&lng=es&tlng=en](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1870-249X2012000300004&lng=es&tlng=en).
17. Vázquez, S. (2022). Metalofármacos Mexicanos: La casiopeínas como agentes quimioterapéuticos. <http://rd.buap.mx>. <http://rd.buap.mx/ojs-dm/index.php/rdicuap/article/view/804/915>
18. Marín-Hernández, A et al., (2003). Toxic effects of copper-based antineoplastic drugs (Casiopeinas®) on mitochondrial functions. *Biochemical pharmacology*, 65(12), 1979-1989.
19. Mishra, Reino Unido y Singh, J. (2008). Física y diseño de dispositivos semiconductores (Vol. 83). Dordrecht: Springer.
20. Michelakis, E, D & Webster, L. (2008). El dicloroacetato (DCA) como una posible terapia dirigida metabólicamente para el cáncer. *Revista británica de cáncer*. 99 (7), 989-994.
21. Berendzen, K. et al., (2006). Therapeutic potential of dichloroacetate for pyruvate dehydrogenase complex deficiency. *Mitochondrion*, 6(3), 126–135. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2006.04.001>
22. Sierra, C. (2011). EFECTO DEL DICLOROACETATO DE SODIO SOBRE LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER IN VITRO Y SOBRE UN MODELO DE MELANOMA MURINO [Tesis de maestría]. UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN.
23. Stacpoole, P. W. et al., (1998). Pharmacokinetics, metabolism and toxicology of dichloroacetate. *Drug metabolism reviews*, 30(3), 499–539. <https://doi.org/10.3109/03602539808996323>

## ANEXOS

**ANEXO 1.** Placa de 96 pozos con MTT de células U87: Se aprecia el cambio de coloración en los pozos de acuerdo a las concentraciones de trabajo.



**ANEXO 2.** Al comenzar con el protocolo de investigación se establecieron 2 líneas celulares de trabajo; U87 y LN-18. En el trabajo se reportaron resultados de las líneas U87 y C6 debido a que en el transcurso de la investigación se presentaron problemas con la línea LN-18 inicialmente establecida, las condiciones y el tiempo que nos llevó su crecimiento no fueron favorables por lo que se decidió eliminarla y sustituirla por C6 para poder llevar a cabo los protocolos planteados.