

Introducción

El cáncer es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en el mundo, siendo el cáncer de mamá el de mayor incidencia a nivel mundial con casi 300.000 casos nuevos registrados en el año 2023. Puntualmente, el cáncer de mama triple negativo es uno de los más agresivos y metastásicos y representa aproximadamente el 15% de los casos de cáncer de mama. La terapia actual trae aparejada una serie de efectos adversos que generan un mal pronóstico en las pacientes, por lo cual surge la necesidad de investigar nuevas estrategias terapéuticas. Se ha demostrado que las especies de cobre poseen un espectro de actividad más amplio y una toxicidad menor que las drogas de platino y se sugiere que sean capaces de superar la resistencia hereditaria y/o adquirida al cisplatino. El objetivo del trabajo es la evaluación *in vitro* de la actividad antitumoral de dos complejos de cobre(II) con hidrazona, [Cu(HL)Cl]·H₂O (Cu1), y el dímero [CuL(i-PrOH)]₂ (Cu2), sobre una línea celular tumoral humana de cáncer de mama triple negativo (MDA-MB-231) en monocapa (2D), incluyendo estudios sobre los posibles mecanismos de acción del compuesto más activo.

Métodos

La actividad citotóxica se probó en modelos 2D de células cáncer de mama de la línea MDA-MB-231 (triple negativo) luego de 24 h de tratamiento con los complejos utilizando el ensayo de MTT.

Se evaluó el efecto del complejo más activo sobre la proliferación celular mediante un ensayo clonogénico.

Se investigaron los posibles mecanismos de muerte celular desencadenados por el complejo más activo:

- Formación de especies reactivas del oxígeno (ERO), respaldado con ensayos de viabilidad celular utilizando secuestradores de ERO.
- Inducción de apoptosis mediante citometría de flujo utilizando la tinción anexina V-FITC/IP.
- Evaluación de células madre cancerígenas mediante citometría de flujo utilizando la tinción con los anticuerpos CD44-PE y CD24-FITC.

Efectos del complejo en sistemas 2D

Viabilidad celular

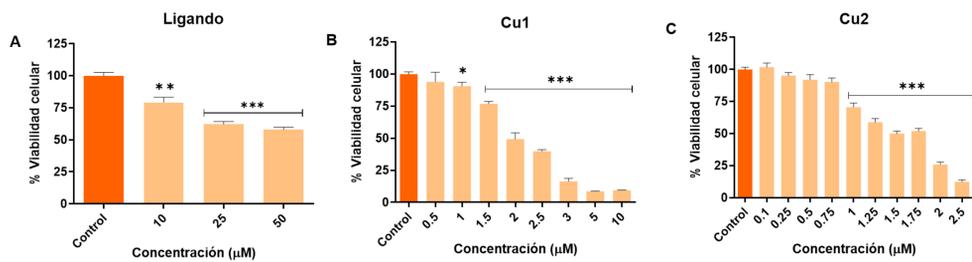


Figura 1. Efecto del ligando (A), Cu1 (B) y Cu2 (C) sobre la viabilidad celular de las células MDA-MB-231 frente a un tratamiento de 24 hs. *(p<0,1), ***(p<0,001) y ****(p<0,0001).

Compuesto	L	Cu1	Cu2
IC ₅₀ (µM)	>50	2,02 ± 0,06	1,30 ± 0,10

Tabla 1. Valores de IC₅₀ luego de 24 hs de incubación con los complejos

Los resultados muestran que, luego de 24 hs de incubación, Cu2 y Cu1 causan citotoxicidad en cultivos 2D de células de mama triple negativo (MDA-MB-231), observándose más actividad para Cu2. A su vez se pudo observar el efecto beneficioso de la complejación, ya que el ligando por separado no muestra dicho efecto sobre la viabilidad celular.

Proliferación celular

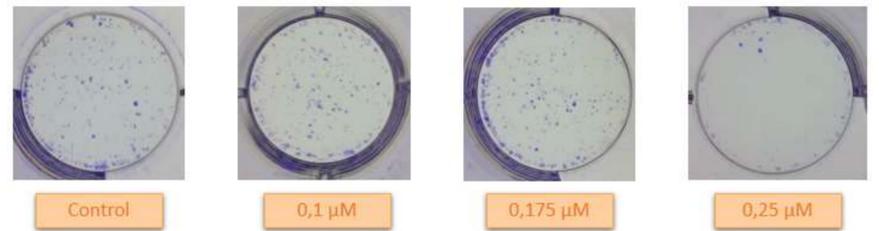


Figura 2. Imágenes representativas de los pocillos con colonias teñidas con cristal violeta y fijadas post tratamiento con Cu2, los valores debajo de ellas corresponden a la concentración en µM.

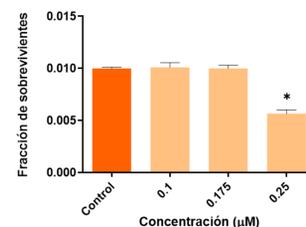


Figura 3. Ensayo clonogénico realizado en células MDA-MB-231 tratadas con Cu2. *(p<0,0001).

Los resultados obtenidos luego de la realización del ensayo clonogénico indican que luego de 24 hs de incubación el complejo reduce significativamente la proliferación celular a partir de 0,25 µM celular en la línea celular en estudio.

Mecanismos de acción

Estrés oxidativo

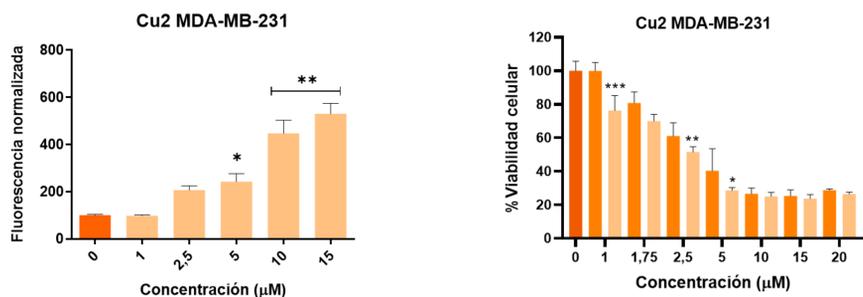


Figura 4. Producción de ERO en línea celular MDA-MB-231 luego de un tratamiento de 3 hs con Cu2. *(p<0,1) y ***(p<0,0001).

La determinación de la formación de especies reactivas del oxígeno (ROS) se realizó mediante la oxidación de dihidrorodamina-123 a rodamina-123, la cual emite fluorescencia a 536 nm. Como puede verse en la Fig. 4, Cu2 tiene la capacidad de generar ERO a partir de 5 µM. El resultado fue respaldado mediante ensayos de viabilidad celular utilizando secuestradores de ERO (Fig. 5).

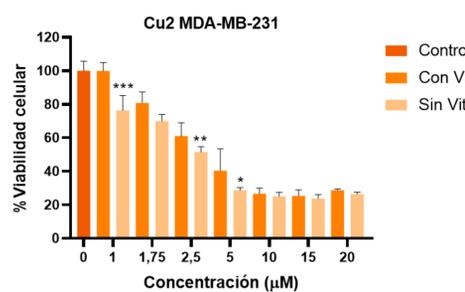


Figura 5. Viabilidad celular de MDA-MB-231 luego del tratamiento de 3 hs con Cu2 en presencia y ausencia de vitaminas. *(p<0,01), ***(p<0,001) y ****(p<0,0001).

Apoptosis

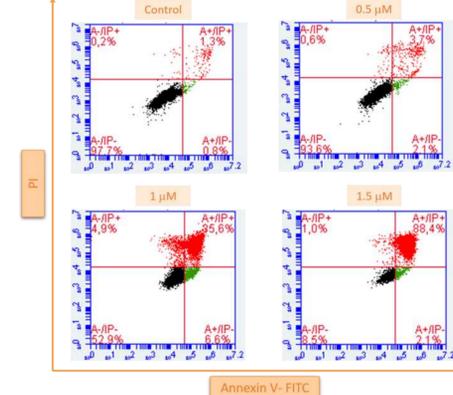


Figura 6. Evaluación de la apoptosis frente al agregado de Cu2 en células MDA-MB-231. La determinación se realizó mediante citometría de flujo por tinción con Anexina V-FITC e IP.

	An-/IP-	An+/IP-	An-/IP+	An+/IP+
Control	97,16	1,17	0,43	1,24
0,5 µM	91,93	3,01	0,43	4,64
1 µM	47,73**	9,13	11,46*	31,68**
1,5 µM	9,22**	1,94	19,27**	69,57**

Tabla 2. Cuantificación de células MDA-MB-231 Anexina V(+)/IP(-), Anexina V(+)/IP(+) y Anexina V(-)/IP(+) como indicadores de apoptosis temprana, tardía y necrosis, respectivamente, representado en tabla. *(p<0,01) y ***(p<0,0001).

Al estudiar la externalización de fosfatidilserina se determinó que en la línea MDA-MB-231 el complejo Cu2 produjo un aumento en la población de células apoptóticas tardías dependiente de la concentración a partir de una concentración de 1 µM.

Células madre cancerígenas (CMC)

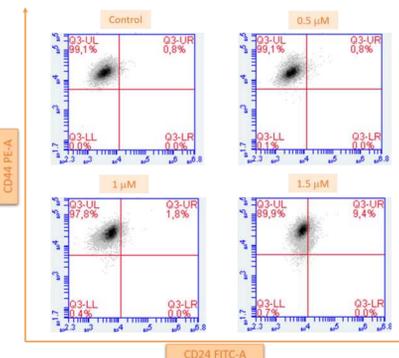


Figura 7. Dot plot correspondiente a la evaluación de CMC frente al agregado de Cu2 en células MDA-MB-231. La determinación se realizó mediante citometría de flujo por tinción con CD24 FITC y CD44 PE.

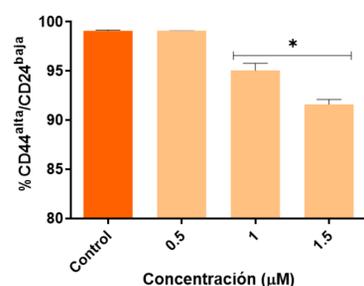


Figura 8. Gráfico de barras obtenido de la evaluación de CMCs mediante tinción con los anticuerpos CD24-FITC y CD44-PE, realizado en células MDA-MB-231 tratadas con Cu2. *(p<0,0001).

Concentración (µM)	CD44+/CD24-
Control	99,09
0,5	99,11
1	95,06*
1,5	91,61*

Tabla 3. Porcentaje de células CD44+/CD24-. *(p<0,0001)

Luego de la tinción con anticuerpos CD24-FITC y CD44-PE, tal como se muestra en las Fig. 7 y 8, se demostró que Cu2 es capaz de disminuir la población de células CD44_{alta}/CD24_{baja} en MDA-MB-231, reduciéndose de 99,09% en el control a 95,06% a una concentración de 1 µM y 91,61% a una concentración de 1,5 µM.

Conclusiones

En el presente estudio, hemos analizado la actividad de complejos de cobre con hidrazonas en particular de un dímero, denominado Cu2, que fue capaz de inhibir el crecimiento y la proliferación celular *in vitro* (2D) de la línea celular de adenocarcinoma de mama triple negativo. A su vez, se observó que dicho compuesto induce la formación de EROs y la apoptosis, además de provocar una disminución en el porcentaje de CMC presentes en las muestras