

# ACTIVIDAD ANTIPROLIFERATIVA Y MECANISMOS DE ACCIÓN DE UN NUEVO Y POTENTE METALOCOMPUESTO ANTICANCERÍGENO CUHL1 EN CÉLULAS HUMANAS DE TNBC

Santa María de la Parra L<sup>1</sup>, Balsa L<sup>1</sup>, Nayeem N<sup>2,3</sup>, Contel M<sup>2,3</sup>, León I<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup>CEQUINOR (UNLP, CCT-CONICET La Plata, asociado a CIC), Universidad Nacional de La Plata, Argentina. [luciasantamaria@quimica.unlp.edu.ar](mailto:luciasantamaria@quimica.unlp.edu.ar)

<sup>2</sup>Brooklyn College Cancer Center BCCC-CURE, Brooklyn College, The City University of New York, 2900 Bedford Avenue, Brooklyn, New York 11210 (USA)

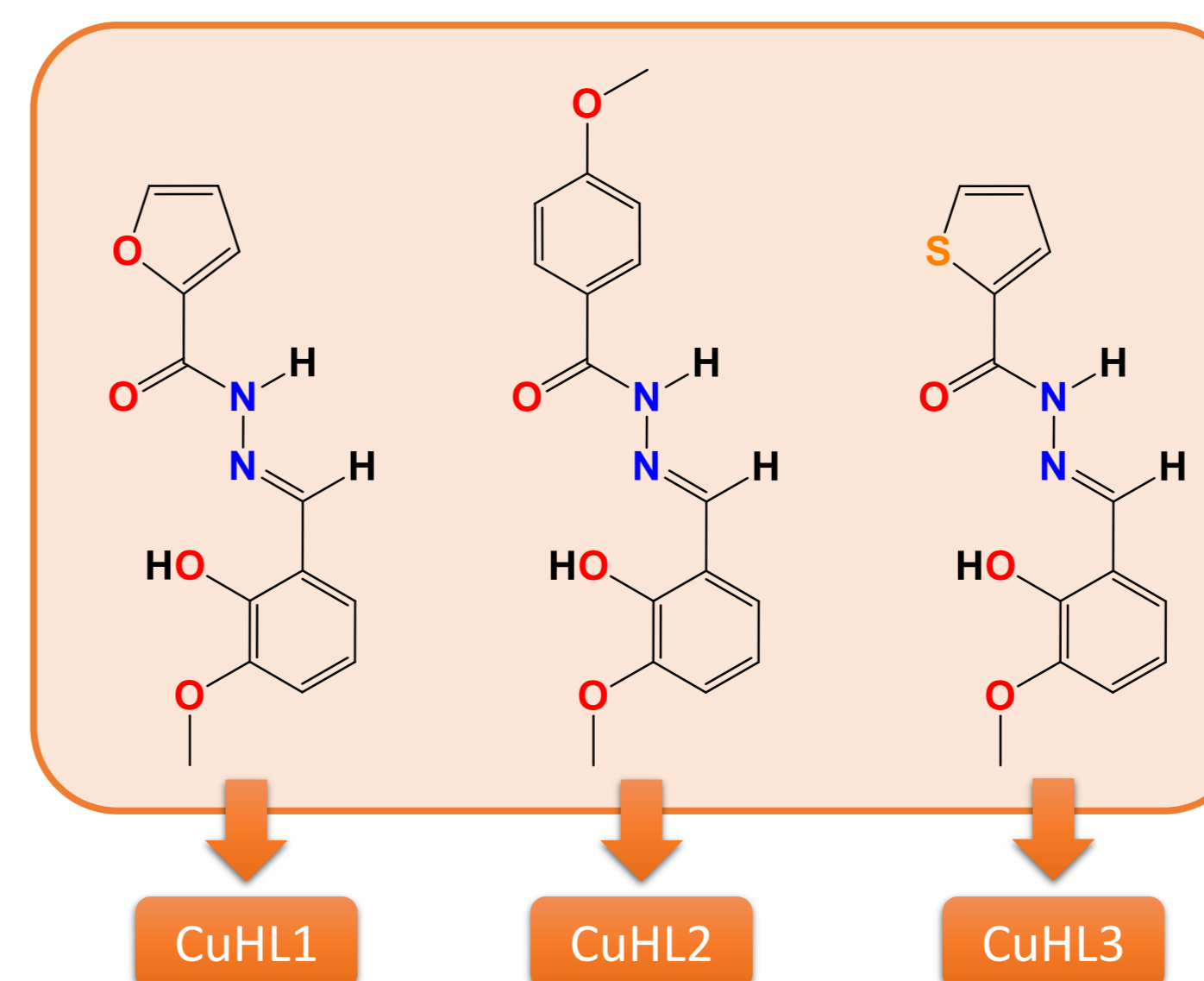
<sup>3</sup>Department of Chemistry, Brooklyn College, The City University of New York, 2900 Bedford Avenue, Brooklyn, New York 11210 (USA)

<sup>4</sup>Cátedra de Fisiopatología, Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, Argentina



## Introducción

El cáncer de mama es el tipo de cáncer más común entre las mujeres, representando el 32.1% de los casos en Argentina. El cáncer de mama triple negativo (TNBC) es un subtipo agresivo de cáncer de mama caracterizado por una alta invasividad, un alto potencial metastásico, propensión a la recaída y un mal pronóstico. Dicho subtipo no responde a la terapia endocrina ni al tratamiento con HER2 porque no expresan el receptor de estrógeno (ER), el receptor de progesterona (PR) ni el receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER-2). Actualmente, las opciones de tratamiento son solo cirugía, quimioterapia adyuvante y radioterapia; sin embargo, algunos pacientes ya han pasado la ventana quirúrgica cuando fueron diagnosticados por primera vez. En consecuencia, desarrollar estrategias terapéuticas innovadoras para el TNBC se ha vuelto esencial para la práctica clínica.



## Complejos de cobre(II)

En este estudio, examinamos el impacto de nuestro complejo de cobre(II) más recientemente sintetizado y caracterizado, CuHL1 [1], en un panel de líneas celulares de TNBC. Para enriquecer la interpretación de los datos obtenidos, comparamos los resultados con aquellos obtenidos para otros complejos de cobre con hidrazonas que nuestro grupo ha estudiado previamente [2,3].

Figura 1. Representación esquemática de los ligandos usados para sintetizar los complejos de Cu(II) estudiados.

## Viabilidad celular

La citotoxicidad de CuHL1 se evaluó utilizando el ensayo Presto Blue, un kit basado en resazurina, en un panel de células de TNBC.

Línea celular	IC <sub>50</sub> (μM)
MDA-MB-231	2,7 ± 0,1
MDA-MB-157	2,5 ± 0,1
MDA-MB-468	1,5 ± 0,3
HCC1806	2,0 ± 0,4

Tabla 1. Valores de IC<sub>50</sub> obtenidos en un panel de células TNBC luego de 24 hs de tratamiento con CuHL1.

Además, comparamos los efectos de CuHL1 y compuestos similares previamente evaluados por nuestro grupo en la línea celular MDA-MB-231.

Línea celular	IC <sub>50</sub> (μM)	Referencias
CuHL1	2,70 ± 0,10	Este trabajo
CuHL2	1,56 ± 0,08	[2]
CuHL3	1,65 ± 0,25	[3]

Tabla 2. Valores de IC<sub>50</sub> determinados en células MDA-MB-231 luego de 24 hs de incubación con los complejos.

## Estrés oxidativo

La determinación de la formación de especies reactivas de oxígeno (EROs) se realizó a través de la oxidación de la sonda 2'-7'-Diclorodihidrofluoresceína diacetato (DCFH-DA) a 2'-7'-diclorofluoresceína (DCF) en presencia de EROs. Dado que DCF fluoresce a 530 nm, la medición se llevó a cabo utilizando un espectrofluorómetro de placas. Determinamos que CuHL1 aumenta significativamente la producción de ROS a 1 y 1,5 μM en la línea celular MDA-MB-231.

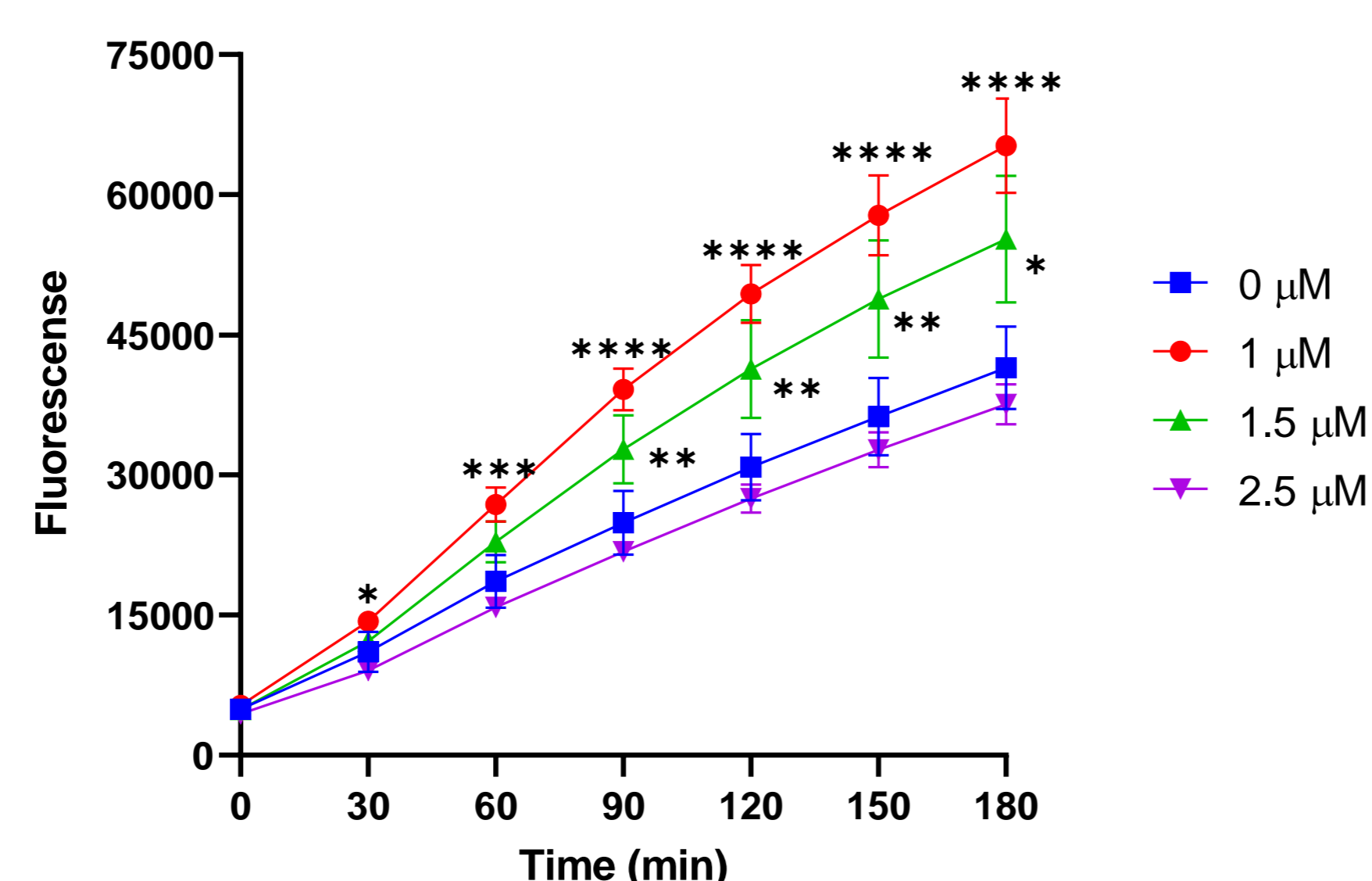
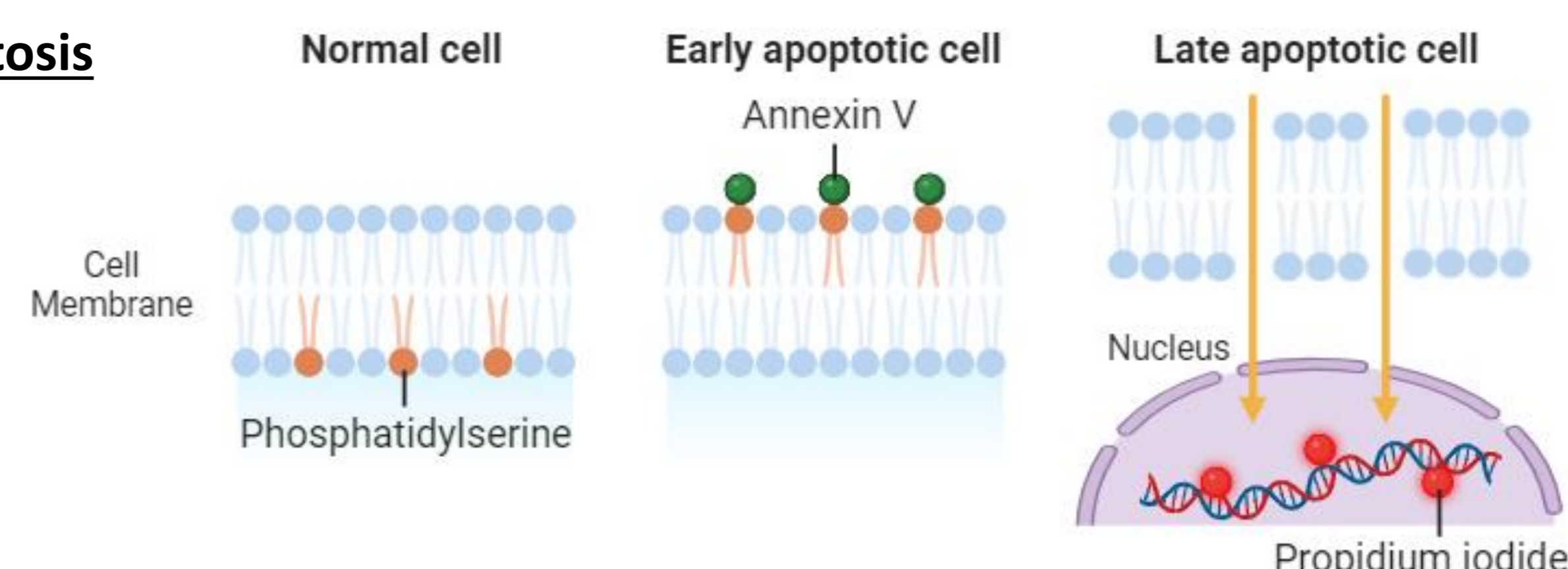


Figura 2. La intensidad de fluorescencia se determinó en células MDA-MB-231 luego de la incubación con CuHL1 desde 0 a 3 hs. \*p<0,1, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001 y \*\*\*\*p<0,0001 diferencias entre Control y tratamiento.

## Inducción de apoptosis

Figura 3. Representación esquemática de la doble tinción con anexina-FITC e IP usado para detectar células apoptóticas.



La apoptosis es un proceso natural de muerte celular desencadenado por agentes dañinos, y la externalización de la fosfatidilserina es un indicador crucial de procesos apoptóticos previos. Determinamos la inducción de apoptosis en células MDA-MB-231 utilizando la técnica de doble tinción con colorantes fluorescentes, yoduro de propidio (IP) y Anexina V-FITC, detectado mediante citometría de flujo. Esta técnica se basa en la afinidad de la Anexina V por la fosfatidilserina, un fosfolípido de la membrana celular. Observamos un aumento en las células apoptóticas tempranas (AnV+/IP-) a 1 y 2,5 μM, y en las células apoptóticas tardías (AnV+/IP+) a 2,5 μM.

Tabla 3. Porcentaje de células apoptóticas tempranas y tardías luego del tratamiento con CuHL1 por 24 hs. \*p<0,05 diferencias entre Control y tratamiento.

Concentración (μM)	An V+/IP-	An V+/IP+	An V-/IP+
0	1,4 ± 0,5	1,1 ± 0,2	1,4 ± 0,8
1,0	3,7 ± 0,1 *	1,6 ± 0,1	1,3 ± 0,3
2,5	7,0 ± 0,9 *	7,7 ± 0,6 *	0,6 ± 0,2

## Análisis proteómico

Pudimos identificar proteínas diferencialmente expresadas entre células MDA-MB-231 tratadas con CuHL1 y no tratadas mediante *label-free quantification* utilizando el Orbitrap LC-MS/MS. De las 907 proteínas identificadas en el conjunto de datos proteómico de células tratadas, 34 proteínas (15 negativamente y 19 positivamente) fueron reconocidas como expresadas diferencialmente después de filtrar por diferencias en el *fold-change* y un *p-value* significativo.

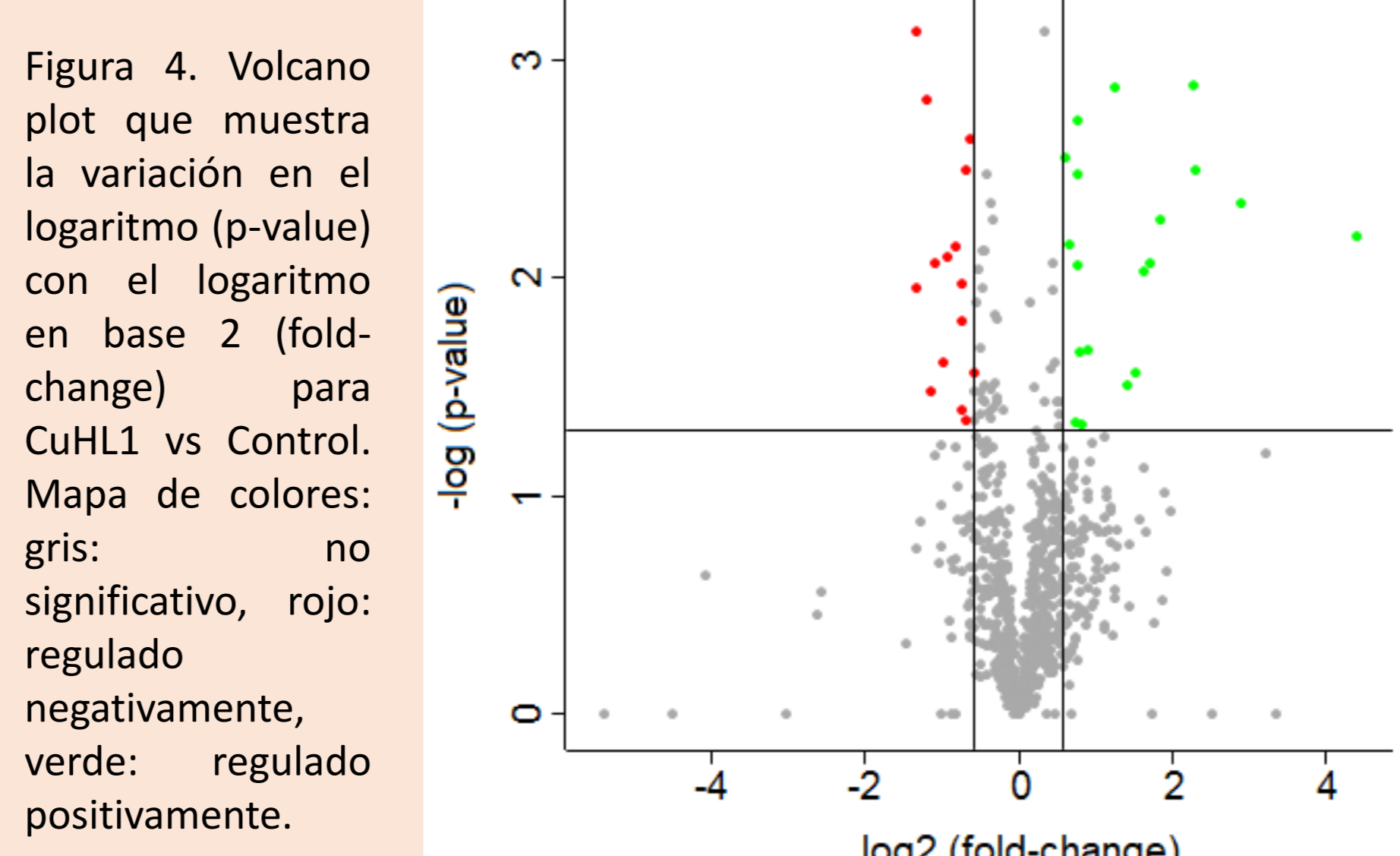


Figura 4. Volcano plot que muestra la variación en el logaritmo (p-value) con el logaritmo en base 2 (fold-change) para CuHL1 vs Control. Mapa de colores: gris: no significativo, rojo: regulado negativamente, verde: regulado positivamente.

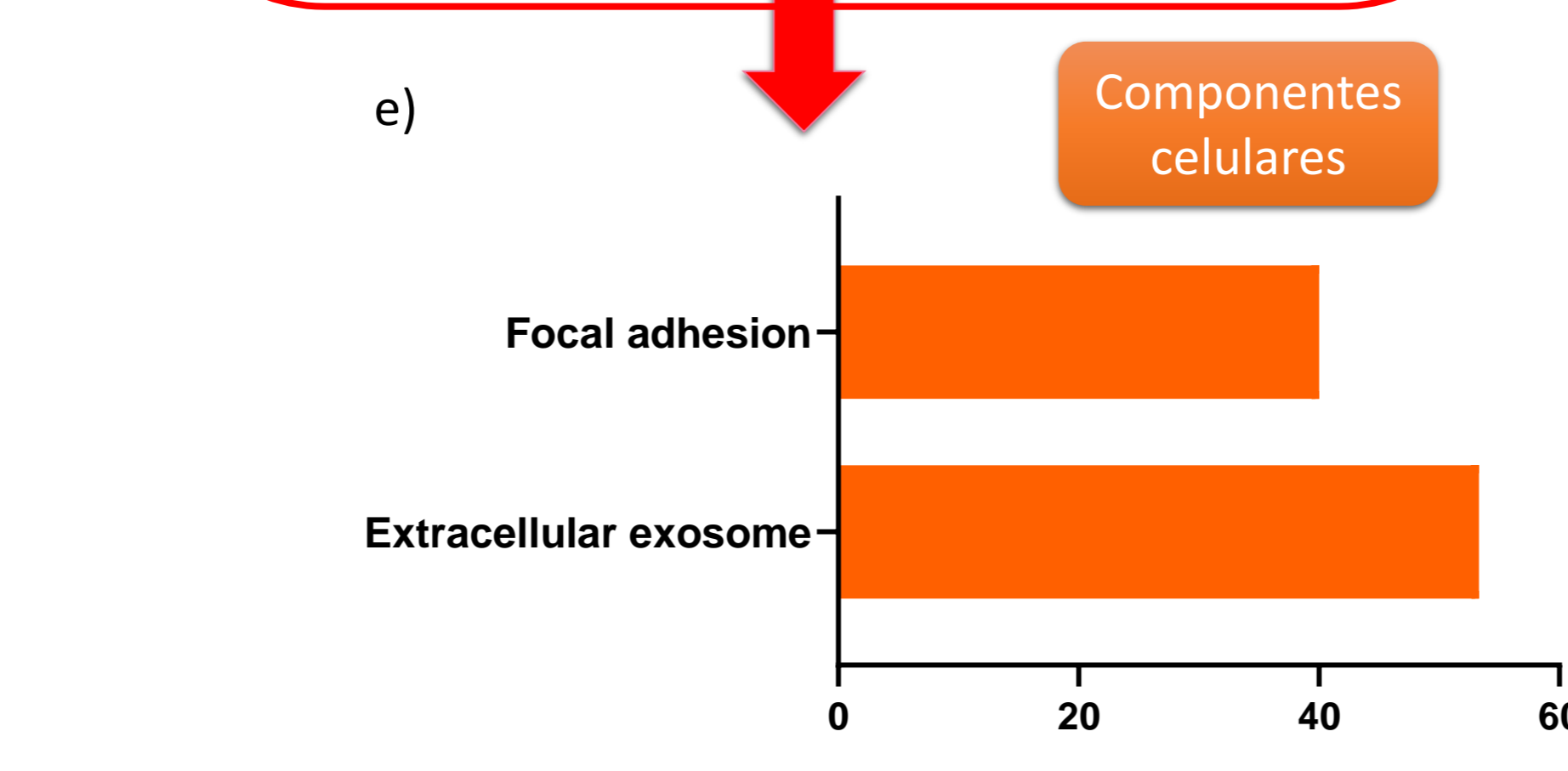
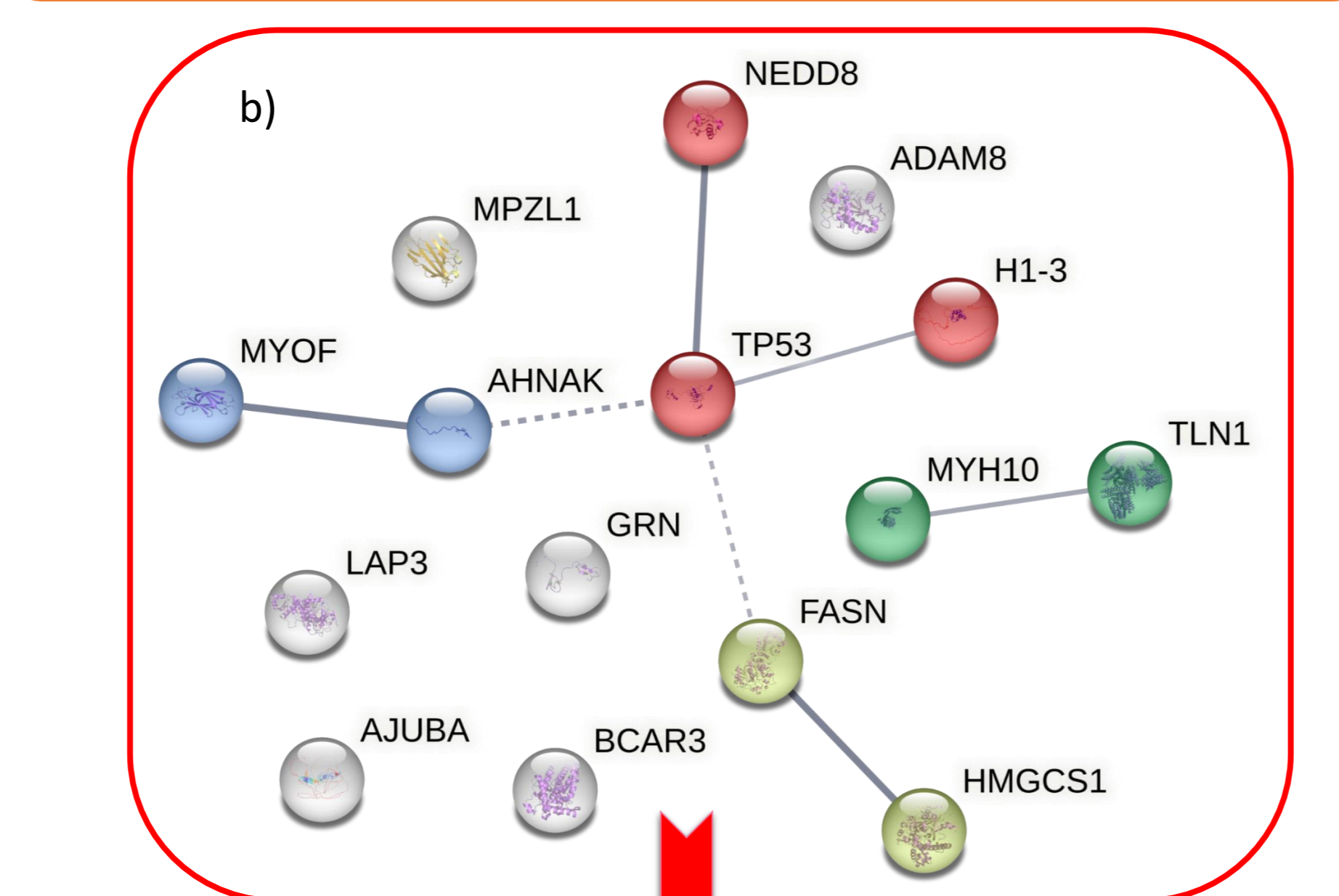
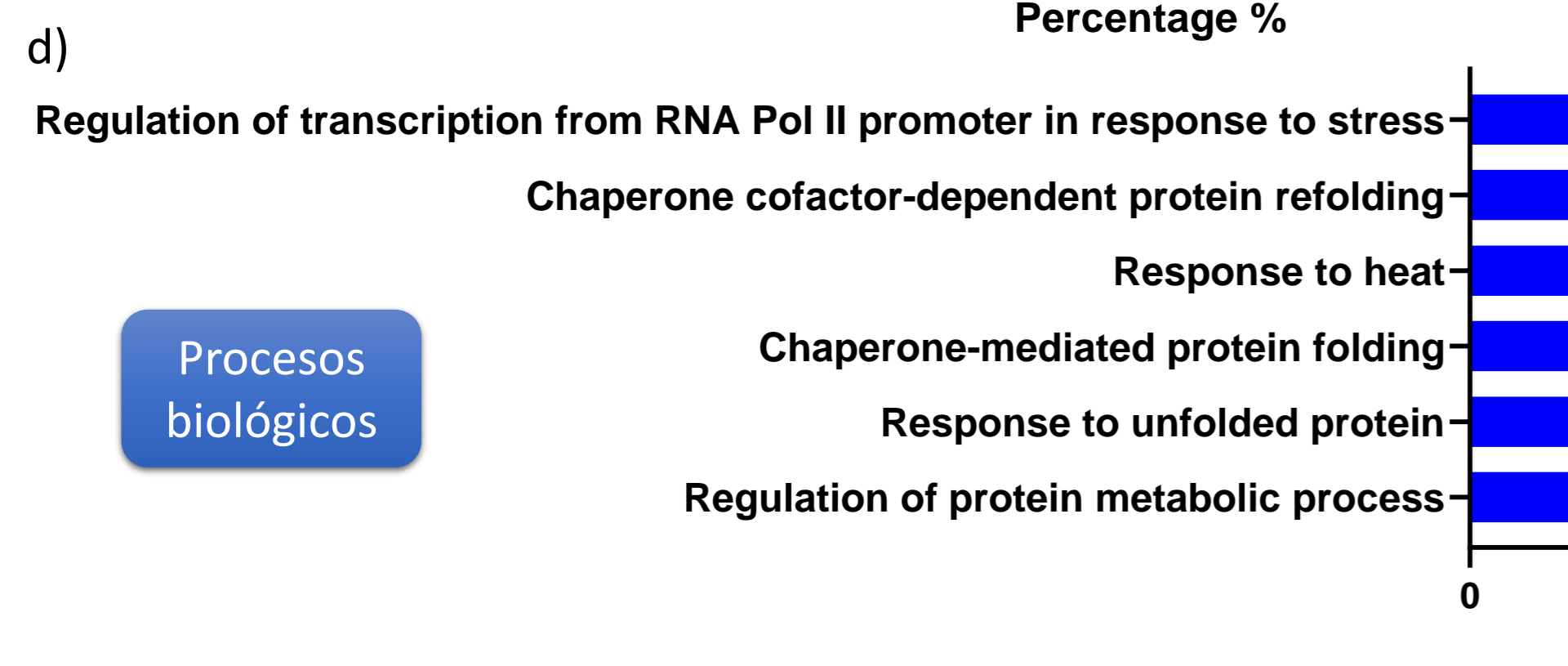
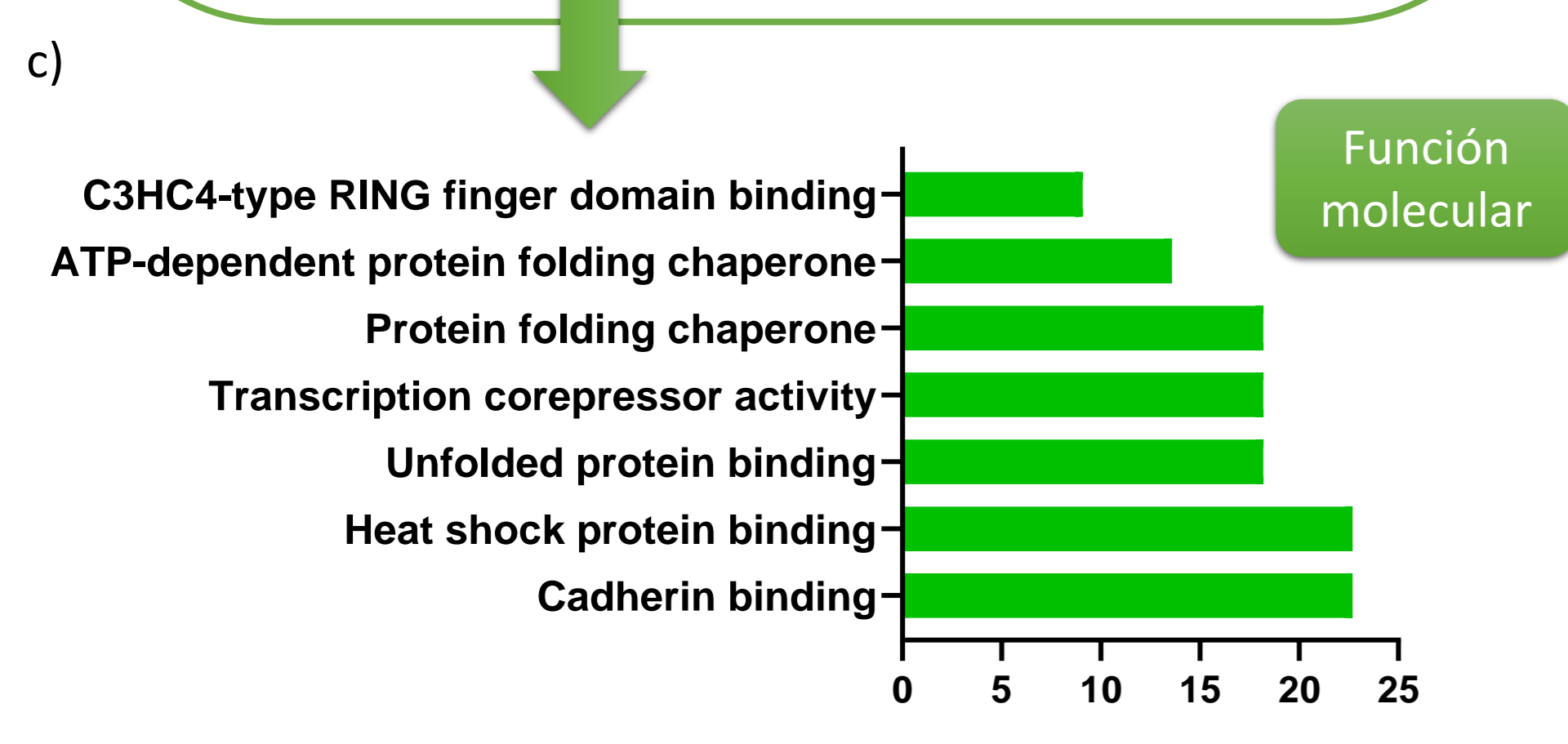
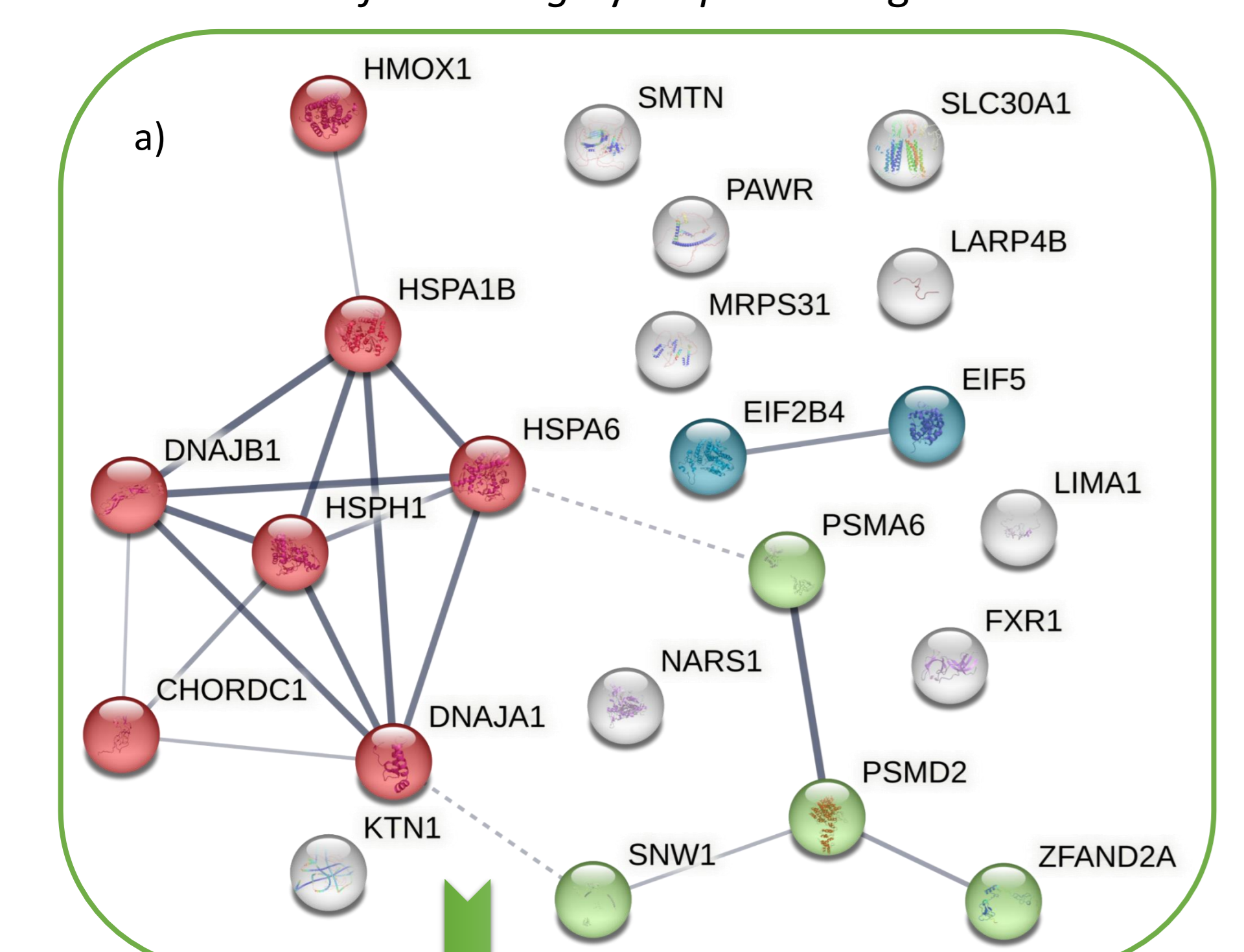


Figura 5. Red de interacción para (a) proteínas reguladas positivamente y (b) proteínas reguladas negativamente en células MDA-MB-231 en respuesta al tratamiento de 24 hs con CuHL1, generada utilizando la base de datos STRING v12.0. Análisis de enriquecimiento de Ontología de Genes (GO) de (c,d) proteínas positiva- y (e) negativamente reguladas en células tratadas con CuHL1.

Tabla 4. Proteínas diferencialmente expresadas en células MDA-MB-231 tratadas con CuHL1 por 24 hs.

Gen	Proteína	Fold-change	p-value
SMTN	Smoothelin	20,9045	0,0064
HSPA6	Heat shock 70 kDa protein 6	7,4105	0,0046
KTN1	Kinectin	4,9072	0,0032
SLC30A1	Zinc transporter 1	4,8464	0,0013
CHORDC1	Cysteine and histidine-rich domain-containing protein 1	3,5834	0,0053
HSPA1B	Heat shock 70 kDa protein 1B	3,2786	0,0084
HSPH1	Heat shock protein 105 kDa	3,1067	0,0093
LIMA1	LIM domain and actin-binding protein 1	2,8545	0,0271
MRPS31	28S ribosomal protein S31, mitochondrial	2,6408	0,031
DNAJA1	DnaJ homolog subfamily A member 1	2,3844	0,0013
NARS1	Asparagine--tRNA ligase, cytoplasmic	1,8718	0,0212
FXR1	Fragile X mental retardation syndrome-related protein 1	1,7476	0,0463
PSMA6	Proteasome subunit alpha type	1,7234	0,0219
SNW1	SNW domain-containing protein 1	1,6963	0,0019
DNAJB1	DnaJ homolog subfamily B member 1	1,6902	0,0034
EIF5	Eukaryotic translation initiation factor 5	1,6859	0,0087
PSMD2	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 2	1,6723	0,0456
PAWR	PRK apoptosis WT1 regulator protein	1,5773	0,007
LARP4B	La-related protein 4B	1,515	0,0028
BCAR3	Breast cancer anti-estrogen resistance protein 3	-1,5008	0,0271
AHNAK	Neuroblast differentiation-associated protein AHNAK	-1,5521	0,0023
LAP3	Cytosol aminopeptidase	-1,5996	0,0451
MYH10	Myosin-10	-1,6206	0,0032
MYOF	Myoferlin	-1,6688	0,0402
TLN1	Talin-1	-1,6811	0,0156
ADAM8	Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 8	-1,6824	0,0107
AJUBA	LIM domain-containing protein ajuba	-1,7689	0,0071
GRN	Progranulin	-1,9055	0,0079
MPZL1	Myelin protein zero-like protein 1	-1,9567	0,0245
HMGCS1	Hydroxymethylglutaryl-CoA synthase, cytoplasmic	-2,1208	0,0085
H1-3	Histone H1.3	-2,1953	0,0327
TP53	Cellular tumor antigen p53	-2,3109	0,0015
NEDD8	NEDD8	-2,5159	0,011
FASN	Fatty acid synthase	-2,5279	0,0007

Utilizamos el análisis de enriquecimiento STRING para analizar las proteínas diferencialmente expresadas. El principal grupo (rojo) de proteínas reguladas positivamente está asociado con las Proteínas de Shock Térmico (HSP) y co-chaperonas, como observamos anteriormente para CuHL2 y CuHL3 [4]; proteínas involucradas en diversas funciones biológicas, incluyendo la asistencia en el plegamiento de proteínas como una respuesta al estrés del retículo endoplásmico. Contrario a lo observado para estos dos complejos, emergió un grupo de proteínas relacionadas con el proteosoma entre las proteínas sobreexpresadas en células tratadas con CuHL1. Para las proteínas reguladas negativamente, encontramos proteínas vinculadas con la adhesión focal y exosomas extracelulares, y al igual que observamos previamente para CuHL2 y CuHL3, proteínas relacionadas con la biosíntesis de lípidos. La línea celular MDA-MB-231 presenta una mutación ganadora de función altamente expresada en p53, que confiere propiedades oncogénicas y se correlaciona con un mal pronóstico. Encontramos que CuHL1 reguló a la baja TP53, un gen supresor de tumores que codifica la proteína p53, y también reguló negativamente BCAR3. Se informó anteriormente que una alta expresión de mRNA de BCAR3, específicamente en TNBC, se correlaciona con peores resultados y efectos de quimiorresistencia en los pacientes.

## Conclusiones

Nuestros hallazgos demostraron un potente efecto citotóxico de CuHL1 en líneas celulares de TNBC, acompañado de un aumento en la producción de EROs y la inducción de apoptosis. Aunque se necesitarían ensayos proteómicos adicionales para validar nuestros resultados, CuHL1 es un candidato prometedor para posibles terapias contra TNBC, y sería interesante seguir probando este complejo en estudios *in vivo*.

## Referencias

- [1] Santa María de la Parra L et al. *Inorg. Chem.* 2024, 63(11), 4925–4938.
- [2] Balsa LM et al. *Dalton Trans.* 2021, 50(28), 9812–9826.
- [3] Balsa LM et al. *ChemMedChem* 2021, 16, 1–14.
- [4] Balsa LM et al. *Int J Mol Sci.* 2023, 24(8), 7531.
- [5] Arras J et al. *Am J Cancer Res.* 2021, 11(10), 4768–4787.