SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE COMPLEJOS DE COBRE(II)-HIDRAZONA Y ESTUDIOS DE LA ACTIVIDAD CANCERÍGENA EN MODELOS IN VITRO E IN VIVO

Lucía Santa Maria de la Parra,[1] Olivia Espindola-Moreno,[1] Matías H. Assandri,[2] Luisina M. Solernó,[3] Gustavo A. Echeverría,[4] Oscar E. Piro,[4] Gonzalo Scalese,[5] María de los A. Serradell,[2] Daniel F. Alonso,[3] Juan Garona,[3] Lucía M. Balsa,[1] Ignacio E. León[1,6]

[1] CEQUINOR (UNLP, CCT-CONICET La Plata, asociado a CIC), Universidad Nacional de La Plata, Blvd. 120, N°1465, La Plata, 1900, Argentina.
[2] Cátedra de Microbiología (FCE, UNLP), Calle 115 y 47 La Plata, Buenos Aires, Argentina
[3] COMTra (UNQ), Roque Sáenz Peña 352, Bernal, Quilmes, Buenos Aires, Argentina
[4] IFLP (CONICET, CCT-La Plata), Diag. 113 entre 63 y 64 s/n, La Plata, Buenos Aires, Argentina
[5] Departamento Estrella Campos (Facultad de Química, Udelar) Av. 18 de Julio 1968, Montevideo, Uruguay
[6] Cátedra de Fisiopatología, Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, Argentina.
E-mail: luciasantamaria@quimica.unlp.edu.ar ; ileon@biol.unlp.edu.ar

VII Jornadas de Química Inorgánica — Prof. Aymonino

Introducción y objetivos

El osteosarcoma (OS) es un tipo frecuente de cáncer óseo que afecta a niños y adultos jóvenes. El cisplatino (CDDP) ha demostrado ser eficaz en el tratamiento de diferentes tipos de cáncer, incluido el OS, aunque el desarrollo de quimiorresistencia y la aparición de efectos secundarios importantes pueden conducir al fracaso terapéutico [1]. Se ha demostrado que nuevas estrategias terapéuticas, entre ellas el uso de compuestos de cobre, presentan un potencial efecto antitumoral y constituyen alternativas a los compuestos de platino empleados habitualmente [2,3]. En este trabajo, se evaluó la actividad antitumoral y los mecanismos de acción de diferentes complejos de Cu(II) (CuHL1, CuHL2 y CuHL3), que contienen ligandos hidrazona tridentados, en modelos *in vitro* e *in vivo* de células MG-63 de osteosarcoma humano.

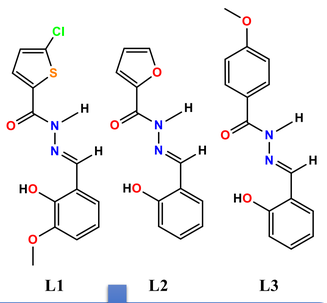
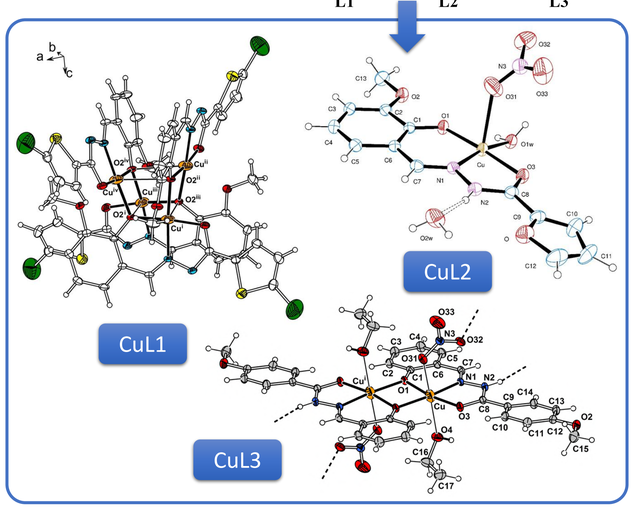


Figura 1. Representación esquemática de los ligandos utilizados para sintetizar los complejos de Cu(II), cuyas estructuras se muestran mediante diagramas ORTEP obtenidos a partir de datos de difracción de rayos X de monocristal. Reportamos los compuestos junto con su caracterización completa [4,5].



Viabilidad celular

La citotoxicidad de los complejos de Cu(II) fue evaluada usando el ensayo de MTT (2D) en células de OSA MG-63.

Tabla 1. Valores de IC_{50} (μM) determinados en células MG-63 después de 24 h de tratamiento.

Complejo	2D
CuL1	0,5 ± 0,1
CuL2	2,3 ± 0,1
CuL3	0,9 ± 0,1
CuLA	2,1 ± 0,3
CuLB	1,1 ± 0,1
CuLC	2,6 ± 0,3
CDDP	39,0 ± 1,8

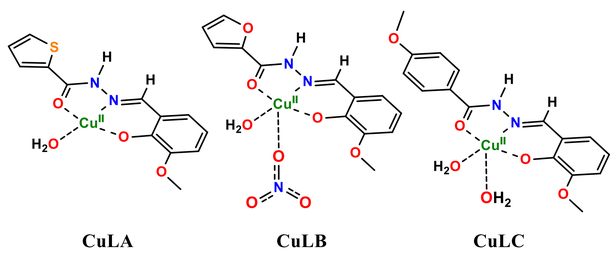


Figura 2. Representación esquemática de los complejos de Cu(II)-hidrazonas previamente reportados por nuestro grupo.

Mecanismos de acción

Se realizaron estudios celulares adicionales para dilucidar los mecanismos de acción de los complejos de Cu(II) en células MG-63. Se evaluaron la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO), mediante la oxidación de DHR, y la inducción de la apoptosis, mediante citometría de flujo, tras 24 h de tratamiento. Los resultados obtenidos con CuL1 se presentan como representativos de los experimentos realizados con todos los complejos.

Producción de ERO

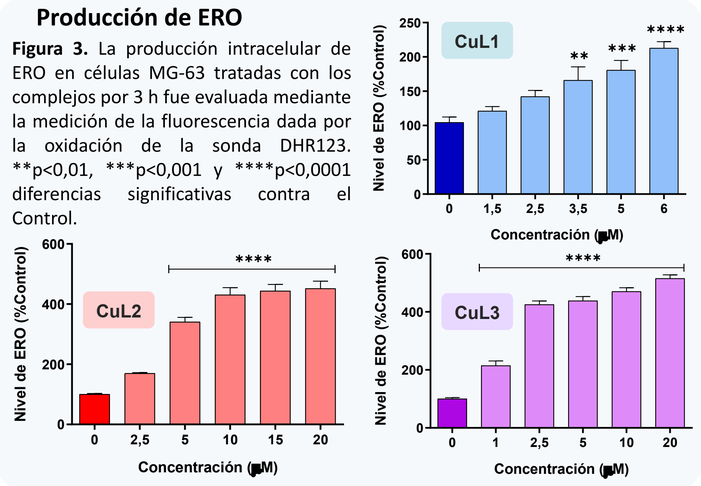


Figura 3. La producción intracelular de ERO en células MG-63 tratadas con los complejos por 3 h fue evaluada mediante la medición de la fluorescencia dada por la oxidación de la sonda DHR123. **p<0,01, ***p<0,001 y ****p<0,0001 diferencias significativas contra el Control.

Apoptosis induction

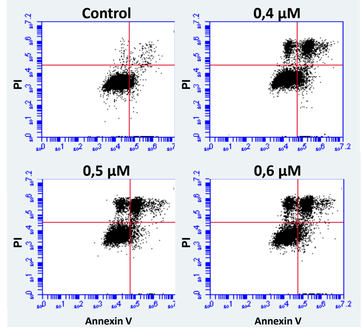


Figura 4. *Dot plots* que muestran la doble marcación con Anexina V-FITC/IP obtenidos en el ensayo de apoptosis por citometría de flujo de células MG-63 incubadas por 24 h con diferentes concentraciones de CuL1 (μM).

Tabla 2. Porcentaje de células en apoptosis temprana y tardía y células necróticas. *p<0,05 y **p<0,001 diferencias entre el grupo Control y el grupo tratado.

Concentración	AnV+/IP−	AnV+/IP+	AnV−/IP+
0	6,2 ± 1,2	2,6 ± 0,3	1,7 ± 0,5
0,4	8,2 ± 1,2	20,9 ± 2,1 *	24,9 ± 10,7 **
0,5	6,1 ± 0,8	19,2 ± 2,6 *	26,4 ± 8,7 **
0,6	10,4 ± 1,1	27,3 ± 1,2 **	18,4 ± 5,3 *

Ensayos en modelos 3D

Los esferoides multicelulares (MCS) de células MG-63 se formaron utilizando la técnica de la gota colgante, en la cual las células capturadas en una gota se juntan por gravedad en el centro de la misma y se unen entre sí.

Viabilidad celular

La viabilidad de esferoides tratados con diferentes concentraciones de los complejos de Cu(II) fue evaluada a través del método de resazurina.

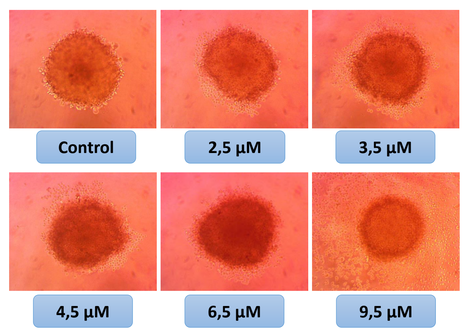


Figura 5. Efecto de los complejos de Cu(II) en modelos 3D. Imágenes representativas de los MCS tratados con CuL1.

Tabla 3. Valores de IC_{50} (μM) determinados en esferoides de MG-63 después de 24 h de tratamiento.

Complejo	3D
CuL1	4,1 ± 0,1
CuL2	25,0 ± 0,4
CuL3	14,7 ± 0,9
CuLA	9,1 ± 1,0
CuLB	16,3 ± 3,1
CuLC	9,9 ± 1,4
CDDP	65,1 ± 5,6

Estudio *In vivo*

Con el objetivo de evaluar los posibles beneficios terapéuticos de CuL1 sobre la progresión del osteosarcoma, se evaluó su actividad en xenoinjertos de células MG-63 implantados en ratones nude macho de la cepa N:NIH(S) $Fox1^{nu/nu}$. CuL1 se administró por vía intraperitoneal (i.p.) a una dosis de 2 mg/kg, 2 veces por semana, durante un total de 5 semanas, una vez confirmada la implantación tumoral.

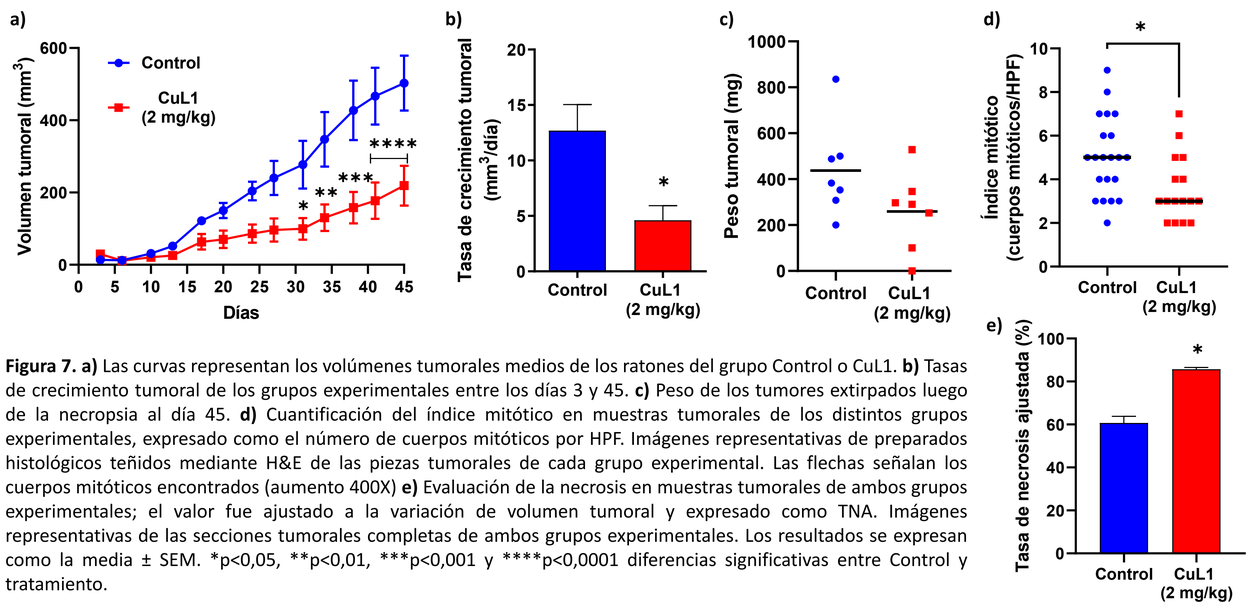


Figura 7. a) Las curvas representan los volúmenes tumorales medios de los ratones del grupo Control o CuL1. **b)** Tasas de crecimiento tumoral de los grupos experimentales entre los días 3 y 45. **c)** Peso de los tumores extirpados luego de la necropsia al día 45. **d)** Cuantificación del índice mitótico en muestras tumorales de los distintos grupos experimentales, expresado como el número de cuerpos mitóticos por HPF. Imágenes representativas de preparados histológicos teñidos mediante H&E de las piezas tumorales de cada grupo experimental. Las flechas señalan los cuerpos mitóticos encontrados (aumento 400X) **e)** Evaluación de la necrosis en muestras tumorales de ambos grupos experimentales; el valor fue ajustado a la variación de volumen tumoral y expresado como TNA. Imágenes representativas de las secciones tumorales completas de ambos grupos experimentales. Los resultados se expresan como la media ± SEM. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 y ****p<0,0001 diferencias significativas entre Control y tratamiento.

Migración celular

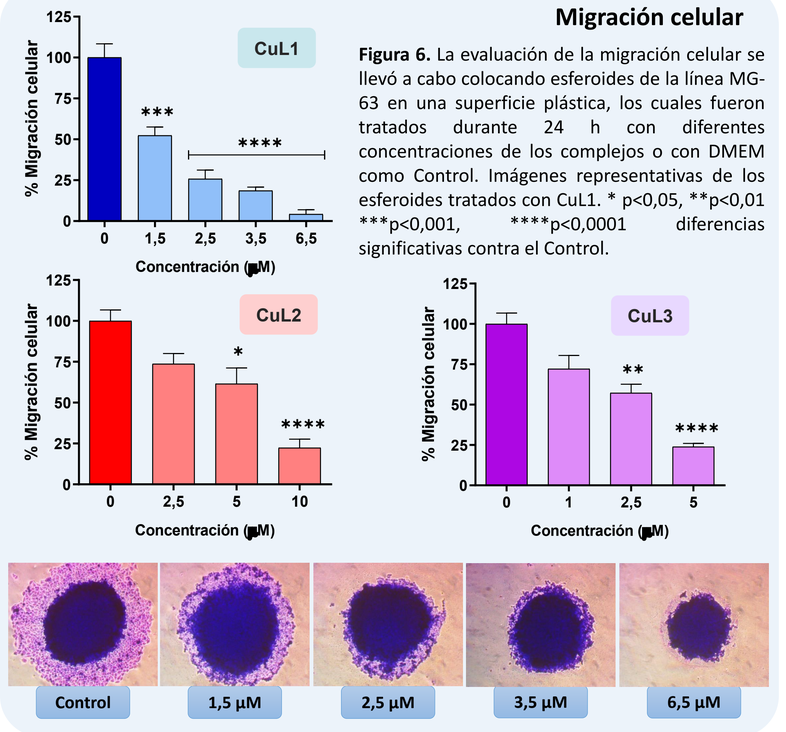


Figura 6. La evaluación de la migración celular se llevó a cabo colocando esferoides de la línea MG-63 en una superficie plástica, los cuales fueron tratados durante 24 h con diferentes concentraciones de los complejos o con DMEM como Control. Imágenes representativas de los esferoides tratados con CuL1. * p<0,05, **p<0,01 ***p<0,001, ****p<0,0001 diferencias significativas contra el Control.

El tratamiento con CuL1 se asoció con una reducción significativa del volumen tumoral desde 502,6 ± 76,3 (Control) a 219,5 ± 55,0 mm^3, lo que corresponde a una inhibición del crecimiento tumoral del 56,3 %, y como puede observarse en la disminución de casi 3 veces la tasa de crecimiento tumoral, en comparación con el grupo Control. Además, el análisis histológico de los tumores evidenció que el tratamiento con CuL1 redujo notablemente el índice mitótico e incrementó la tasa de necrosis tumoral ajustada en comparación con el grupo Control

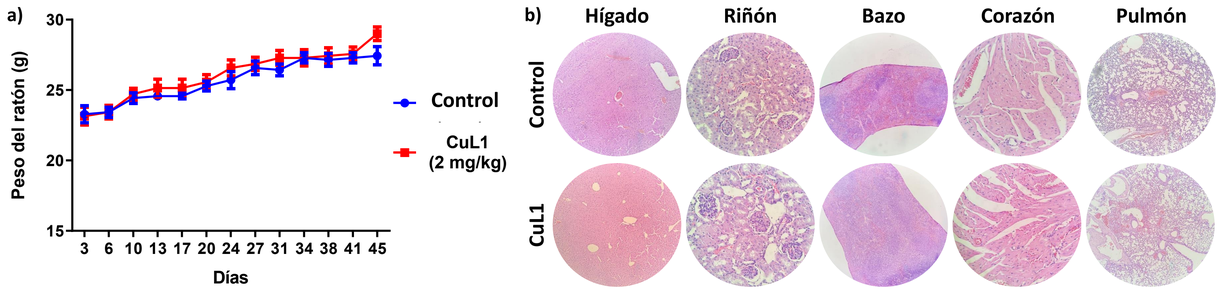


Figura 8. a) El peso corporal de los ratones *nude* portadores de xenoinjertos de OSA pertenecientes al grupo Control o tratados con CuL1, se monitorizó durante todo el estudio *in vivo* para descartar la presencia de toxicidad asociada al tratamiento con CuL1. **b)** Micrografías representativas de los tejidos renal, hepático, cerebral, esplénico, cardíaco y pulmonar obtenidos de ratones tratados con los complejos o con el vehículo salino (Control), teñidos con hematoxilina y eosina, con el objetivo de realizar una evaluación histopatológica. Aumento: 400X.

	Parámetros							
	Peso (g)	Hematocrito (%)	GR (10^6/μL)	GB (10^3/μL)	Proteína Total (g/dL)	Creatinina (mg/mL)	AST (UI/L)	ALT (UI/L)
Control	27,4±0,7	41,5±1,6	7,5±1,7	4,3±1,1	5,4±0,1	0,8±0,4	211,8±84,9	129,7±64,1
CuL1	29,0±0,5	44,3±0,6	8,0±0,1	4,5±0,5	5,4±0,2	0,6±0,1	99,1±19,8	63,6±22,5

	Recuento leucocitario absoluto					
	Neutrófilos en cayado	Neutrófilos segmentados	Eosinófilos	Basófilos	Linfocitos	Monocitos
Control	1.8±1.3	59.5±13.3	1.5±1.1	0.0±0.0	33.0±8.6	4.3±2.5
CuL1	1.6±0.5	52.0±4.8	2.3±0.6	0.0±0.0	40.4±4.3	3.6±1.5

Tabla 4. Arriba: Parámetros bioquímicos y hematológicos generales en ratones tras el tratamiento prolongado con CuL1, en comparación con los animales Control. RBC: glóbulos rojos; GB: glóbulos blancos; AST: aspartato aminotransferasa; ALT: alanina aminotransferasa; UI: unidades internacionales. **Abajo**: Recuento absoluto de leucocitos en ratones tras el tratamiento prolongado con CuL1, en comparación con los animales Control.

No se observaron alteraciones histopatológicas ni signos relevantes de toxicidad en los tejidos hepático, esplénico o cardíaco. Se registraron aumentos no significativos en los niveles de alanina aminotransferasa y aspartato aminotransferasa en los animales tratados con CuL1. Además, los niveles de proteínas totales y creatinina, esta última utilizada como indicador de la función renal, permanecieron inalterados en los animales tratados con CuL1.

Conclusiones

En este estudio, demostramos la actividad anticancerígena de una serie de compuestos de cobre con ligandos hidrazona frente al OSA, tanto en modelos *in vitro* como *in vivo*. Demostramos que estos complejos tienen como mecanismos de acción la producción de ERO y la inducción de apoptosis, además de afectar la migración celular de las células. Considerando la actividad antitumoral del complejo CuL1, así como las escasas opciones terapéuticas disponibles para el tratamiento del OSA, nuestros resultados indican que este complejo constituye un candidato prometedor para el desarrollo de potenciales terapias antitumorales.

Agradecimientos

CONICET — CEQUINOR CONICET UNLP

Referencias

[1] R. Gorlick et al, J. Bone Miner. Res., 25, 683-691 (2010).
[2] L. Balsa et al., Curr Med Chem, 384, 110685 (2023).
[3] L. Santa Maria de la Parra et al., Drug Discov. Today, 29(9), 104100 (2024).
[4] L. Santa Maria de la Parra et al., Pharmaceutics, 18(3), 372 (2026).
[5] L. Santa Maria de la Parra et al., Front. Chem., 14,1897476 (2026).