

Complejos de Cu(II): Alternativas en la terapia antineoplásica

Karla Jazmín Soto Arredondo*, Karla Y. Barbosa Sabanero*, Gloria Barbosa Sabanero***, Lérica L. Flores Villavicencio***, J. Javier Martín Polo**, Guillermo Mendoza Díaz**, Myrna Sabanero López*

RESUMEN

En el presente estudio, fué evaluada la actividad biológica de nuevos complejos de cobre (II) fenantrolina unidos a aminoácidos, como ácido glutámico, isoleucina y α -metil-dopa. Para ésto se utilizaron células neoplásicas de pulmón humano y dos dosis (30 y 60 $\mu\text{g/ml}$) de los compuestos fueron aplicadas a los cultivos celulares. También se realizaron ensayos inmunocitoquímicos para microtúbulos, microfilamentos y electroforesis del DNA genómico. Los resultados obtenidos muestran que los complejos de Cu (II) fenantrolina con ácido glutámico y α -metil-dopa afectan la adhesión celular (50% y 45%, respectivamente), alterando la distribución de los microtúbulos y microfilamentos. La fragmentación del DNA, apoya el ensayo del efecto antitumoral del Cu (II) fenantrolina con ácido glutámico y α -metil-dopa sobre los cultivos de células de pulmón humano in vitro, de manera dosis dependiente. En conclusión, los complejos de Cu (II) fenantrolina con ácido glutámico y α -metil-dopa, presentan un efecto significativo sobre la actividad celular, sugiriendo que estos complejos podrían ser potencialmente compuestos antitumorales.

ABSTRACT

In this study, the biological activity of new copper (II) phenanthroline compounds bound to amino acids such as glutamic acid, isoleucine and α -methyl dopa was evaluated. To accomplish this, tumor cells from the human lung and two doses of compounds (30 and 60 $\mu\text{g/ml}$) were applied to cell cultures. Also, immunostaining of microtubules, phalloidin staining of microfilaments, and electrophoresis of genomic DNA were performed. The results showed that compounds of Cu(II) phenanthroline with glutamic acid and α methyl-dopa significantly affected cellular adhesion (by 50% and 45%, respectively) by altering the distribution of microtubules and microfilaments. Evaluation of DNA fragmentation supported the tumor suppressing effect of Cu (II) Phenanthroline with glutamic acid and α -Methyl Dopa on human lung cell cultures in vitro in a dose-dependent manner. In conclusion, Cu (II) phenanthroline with glutamic acid and α -Methyl Dopa compounds demonstrated significant influence on cellular activity effects on tumor cells, suggesting that these compounds have the potential to be useful in the suppression of tumors.

Recibido: 12 de Enero de 2009
Aceptado: 17 de Septiembre de 2009

INTRODUCCIÓN

El cáncer es una de las principales causas de muerte a nivel mundial. En México 10% del total de muertes anuales son a causa de algún tipo de cáncer. Particularmente el cáncer de pulmón tiene una incidencia de 68,1% en hombres y 31,9% en mujeres indicando que esta neoplasia ocupó el primer lugar en causas de muerte por cáncer en México (Fernández, 2005; Ruiz y col., 2007).

La Quimioterapia es el tratamiento más utilizado contra el cáncer. Las drogas más comunes en la práctica clínica son: cisplatino, paclitaxel, metotrexate, irinotecan, vinblastina y taxol; (Caron and Herwood, 2007); sin embargo, los medicamentos provocan efectos adversos por el grado de toxicidad para las células sanas del organismo y, el desarrollo de resistencia a la quimioterapia.

Palabras clave:

Cu-complejos de coordinación; Antineoplásico, Adhesión; Microtúbulos; Fragmentación de ADN.

Keywords:

Cu-coordination complex; Antineoplastic; Adhesion; Microtubules; DNA fragmentation.

* Departamento de Biología, División de Ciencias Naturales y Exactas, Campus Guanajuato, Universidad de Guanajuato. Noria Alta S/N; C.P. 36050; Guanajuato, Gto. Tel. (473) 732 20 34, Correo Electrónico: karlajsa@hotmail.com, myrna@quijote.ugto.mx.

** Departamento de Química, División de Ciencias Naturales y Exactas, Campus Guanajuato, Universidad de Guanajuato. Noria Alta S/N; C.P. 36050; Guanajuato, Gto. Tel. (473) 732 20 34.

*** Departamento de Ciencias Médicas, División de Ciencias de la Salud, Campus León, Universidad de Guanajuato. 20 de Enero No. 929; Col. Obregón; C.P. 37000; León, Gto. Tel. (477) 714 38 12.

En la actualidad, se ha estudiado la actividad de una serie de complejos metálicos en el tratamiento de diversas enfermedades, entre ellas el cáncer; estos son complejos quelato de Cobre (II), cuya fórmula general es $[Cu(N-N)(N-O)H_2O]NO_3$, los cuales han demostrado actividad citostática y antineoplásica (Selvakumar, 2006).

En el presente trabajo, se analiza en células transformadas de epitelio pulmonar humano la actividad antineoplásica de los complejos de coordinación de Cobre (II) del tipo $[Cu-1,10-Fenantrolina]$, ligados a aminoácidos activos biológicamente tales como: ácido glutámico (**AG**), α -metildopa (**AM**) e isoleucina (**IS**), sintetizados en la Facultad de Química de la Universidad de Guanajuato (Polo y col., 2003), (Fig. 1). Los resultados indican que los complejos $[Cu(1,10-fenantrolina)(\text{ácido glutámico})]^+$ y $[Cu(1,10-fenantrolina)(\alpha\text{-metil-dopa})]^+$ presentan actividad antineoplásica, alterando: la adhesión celular, la integridad del DNA genómico, el citoesqueleto de microfilamentos y microtúbulos que participa en la proliferación celular.

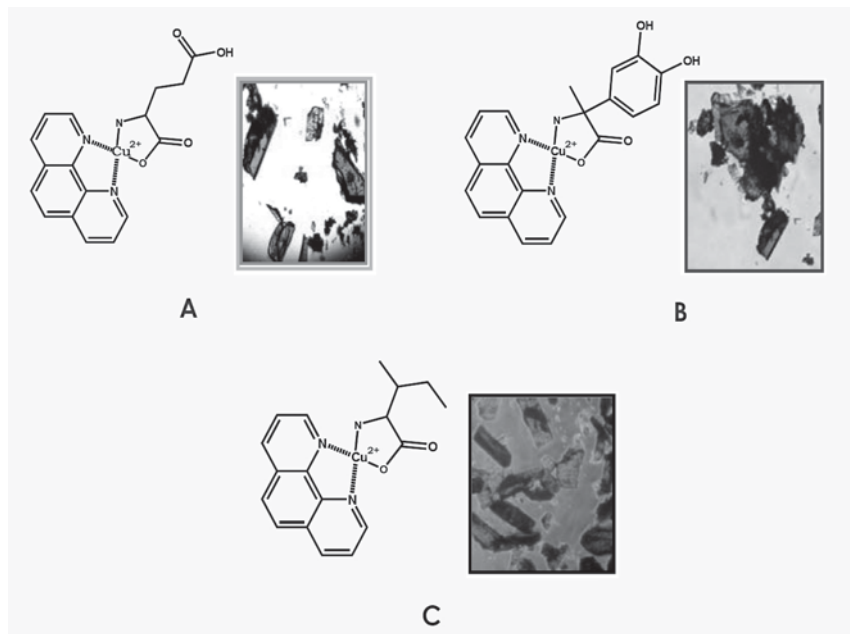


Figura 1. Estructura química y forma cristalina de los complejos de coordinación de $[Cu(1,10-fenantrolina)(\text{aminoácidos})]^+$. En A) Complejo **AG**: $[Cu(1,10-fenantrolina)(\text{ácido glutámico})]^+$; B) Complejo **AM**: $[Cu(1,10-fenantrolina)(\alpha\text{-metil-dopa})]^+$ y C) Complejo **IS**: $[Cu(1,10-fenantrolina)(\text{isoleucina})]^+$.

METODOLOGÍA

- I. *Cultivos celulares.* Se utilizó la línea celular A549 (ATCC-CCL185) que corresponde a células transformadas de epitelio pulmonar humano. Las células se cultivaron en medio de Dubelcco's modificado (GIBCO, EUA) enriquecido con suero fetal bovino al 10% (GIBCO). Los cultivos celulares se incubaron a 37°C y 5% de CO_2 , (Freshney, 2000) después de 48 h de cultivo, en las monocapas se efectuaron los experimentos que se describen a continuación.
- II. *Tratamiento de los epitelios pulmonares con los complejos de $[Cu(fen)(aa's)]^+$.* Los compuestos $[Cu(1,10-fenantrolina)(\text{ácido glutámico})]^+$: **AG** $[Cu(1,10-fenantrolina)(\alpha\text{-metil-dopa})]^+$: **AM** y $[Cu(1,10-$

$fenantrolina)(\text{isoleucina})]^+$: **IS**, se adicionaron a los cultivos a las concentraciones y tiempos que se muestran en la Tabla 1. Se comparó su actividad con vinblastina un antineoplásico de uso intrahospitalario.

Tabla 1. Diferentes concentraciones de los complejos $[Cu(fen)(aa's)]^+$ adicionados a cultivos celulares.

Compuesto	Concentración ($\mu\text{g/ml}$)	Tiempo (h)
Vinblastina	10*	3, 6*, 8
AG	30	3, 6*, 8
	60*	
AM	30	3, 6*, 8
	60*	
IS	30	3, 6*, 8
	60*	

* Mejores condiciones experimentales en las cuales se observa el efecto.

La concentración y el tiempo marcados con asterisco representan las mejores condiciones experimentales en las cuales se observa el efecto. Después del tratamiento, en las preparaciones se analizó: (i).- Los cambios morfológicos que presentaron las células expuestas con respecto a un cultivo control, éste es, sin tratamiento, (ii).- La adhesión celular, (iii).- El perfil de proteínas, (iv).- El citoesqueleto de microtúbulos y microfilamentos y (v).- El DNA de las células expuestas a los complejos.

III. *Adhesión celular.* Los cultivos control y los tratados con los complejos o vinblastina se fijaron y tiñeron con azul de metileno al 0,1% disuelto en regulador de boratos (Lezama y col., 2001). Posteriormente se lisaron con HCl 0.1N y se midió la absorbancia a 630 nm (Beckman DU-7-Spectrophotometer).

IV. *Electroforesis de proteínas:* Las muestras tratadas con inhibidores de proteasas, se prepararon para electroforesis según el método de Laemmli (1970). Fraccionando

las proteínas (20 µg - 30 µg) en geles de SDS-Poliacrilamida al 10%, y se tiñieron con azul de Coomassie al 0,25%.

V. *Citoesqueleto de microtúbulos y microfilamentos*: Después de la interacción de los cultivos celulares con los complejos de [Cu(fen)(aa's)]⁺ y la droga antineoplásica vinblastina, las muestras se fijaron con paraformaldehído al 4% y se permeabilizaron con Tritón X-100 0,5%. Posteriormente, se incubaron con anticuerpos monoclonales Anti β-Tubulina y Anti-Ratón IgG conjugado a (FITC) Isotiocianato de Fluoresceína (Zymed Laboratories, Inc). Otras preparaciones fueron tratadas con Faloidina marcada con FITC (Sigma Chemical) para teñir los microfilamentos (Sabanero y col., 2006). Las preparaciones se observaron en un microscopio de epifluorescencia Nikon HFX-II con filtro B de Exc= 494-518 nm.

VII. *Extracción de DNA*. En las preparaciones de células control, expuestas a los complejos de [Cu(fen)(aa's)]⁺ y vinblastina, se realizó la extracción de DNA (Maniatis, 1990). Posteriormente, se analizó el DNA en geles de agarosa al 1%. Los geles fueron observados con luz UV en Gene Genius (Syngene).

RESULTADOS

Tratamiento de los epitelios pulmonares con los complejos de [Cu(fen)(aa's)]⁺. Después de la interacción de los cultivos celulares con los complejos **AG**, **AM** y **IS** (60 µg/mL) o vinblastina (10 mg/mL), se observa que el epitelio pulmonar expuesto al complejo **AG** (Fig. 2C), presenta alteraciones morfológicas, pérdida de uniones intercelulares y

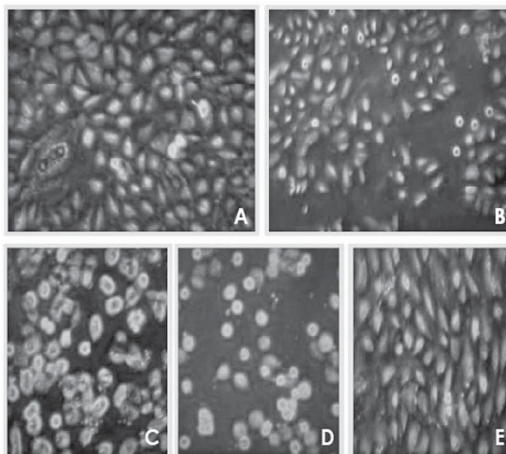


Figura 2. Efecto de los complejos de coordinación [Cu(fen)(aa's)]⁺ sobre el epitelio pulmonar expuestos a los complejos (60 µg/mL) y a vinblastina (10 µg/mL). A) Control, B) Vinblastina, C) AG, D) AM, E) IS. X400.

disminución del volumen celular, similares a los que presentan las células expuestas con vinblastina (Fig. 2B). El epitelio pulmonar expuesto al complejo **AM** (Fig. 2D), muestra cambios morfológicos similares a los descritos para el complejo **AG**. El epitelio pulmonar expuesto al complejo **IS** (Fig. 2E), no presenta cambios con respecto al epitelio control que no ha sido expuesto a ninguno de los complejos.

Adhesión celular. Las células tratadas con el complejo **AG**, **AM** y vinblastina, muestran alteración en la adhesión celular. Los complejos **AG** y **AM** presentan 50 % y 45 % de células adheridas al sustrato respectivamente. Vinblastina presenta un 45 % de adhesión, esto indica que casi la mitad de las células perdieron su capacidad de unirse al sustrato sugiriendo que los complejos **AG** y **AM** presentan una actividad sobre la adhesión similar a la vinblastina. En contraste, los epitelios pulmonares expuestos con el complejo **IS** muestran 100 % de adhesión celular similar a la del cultivo control (Fig. 3).

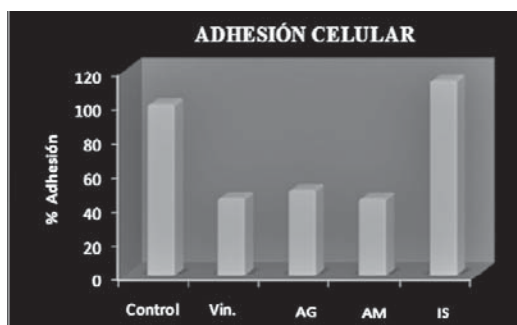


Figura 3. Acción de los complejos [Cu(fen)(aa's)]⁺ sobre la adhesión celular. El epitelio pulmonar control = 100%, los expuestos a los complejos: AG = 50%, AM = 45%, IS = 113% y Vinblastina = 45%.

Perfil de proteínas. La Figura 4 muestra el perfil de proteínas en células epiteliales control (carril 1 y 6), las expuestas a los complejos de [Cu(fen)(aa's)]⁺ (carriles 2-4) y vinblastina (carril 5). Se observan péptidos de alto ($M_r \geq 180 - 90$ kDa), mediano ($M_r \leq 90 - 50$ kDa) y bajo peso molecular ($M_r \leq 50 - 20$ kDa). Vinblastina y los complejos **AG** y **AM** mantienen un patrón de péptidos similar, no obstante, existen alteraciones cuantitativas en el perfil de las proteínas de las células control (carriles 1 y 6) comparados con los complejos **AG**, **AM** y Vinblastina (carriles 2, 3 y 5), con respecto a las proteínas $M_r \leq 90-50$ kDa y $M_r \leq 50-20$ kDa de los complejos con respecto al control.

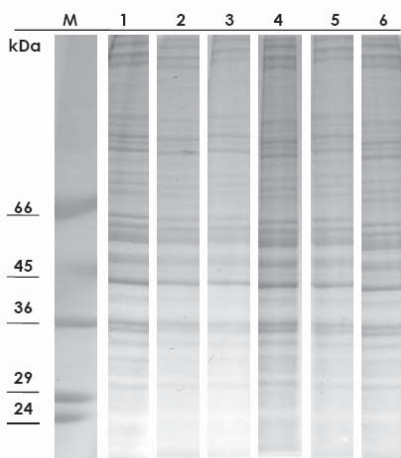


Figura 4. Perfil de proteínas del epitelio pulmonar expuestos a los complejos [Cu(fen)(aa's)]⁺. Marcadores de peso molecular (M) y los cultivos: Control (Carril 1 y 6), expuestos a los complejos: AG (Carril 2), AM (Carril 3), IS (Carril 4) y Vinblastina (Carril 5).

Estructuras del Citoesqueleto.

Se analizaron la distribución de microtúbulos (Fig. 5) y de microfilamentos (Fig. 6). Los epitelios expuestos a los complejos **AG** y **AM** (Fig. 5C y 5D), al igual que vinblastina (Fig. 5B), alteran la integridad del citoesqueleto de microtúbulos. El complejo **IS** (Fig. 5E) no altera la distribución de los microtúbulos, siendo ésta similar a la que presentan los epitelios control (Fig. 5A).

Respecto a los microfilamentos en los cultivos control (Fig. 6A) y los

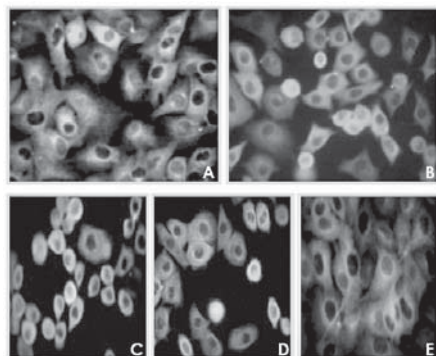


Figura 5. Citoesqueleto de microtúbulos de epitelio pulmonar expuesto a los complejos [Cu(fen)(aa's)]⁺. A) Control y expuestos a: B) Vinblastina y a los complejos C) AG, D) AM, E) IS. X400.

tratados con el complejo **IS** (Fig. 6E), se observa la distribución normal de microfilamentos que delimitan la morfología de las células. Esta distribución se pierde en las células tratadas con los complejos **AG** y **AM** (Fig. 6C y 6D) alterándose la morfología celular.

Análisis de DNA.

En los cultivos de células control (Fig. 7 carril 1), y los expuestos al complejo **IS** y a vinblastina (Fig. 7 carril 4 y 5) el DNA genómico se observa íntegro, en contraste, los cultivos expuestos a los complejos **AG** y **AM** (Fig. 7 carriles 2 y 3) presentan una degradación en el DNA genómico, siendo ésta más evidente en las células expuestas al complejo **AM** (Carril 3).

DISCUSIÓN

En el presente trabajo se analizó la potencial actividad antineoplásica de complejos de coordinación de Cu(II) sobre células de pulmón humano. Se contrastó la actividad de los complejos con la que presenta vinblastina, un antineoplásico clásico de uso intrahospitalario extraído de Catharanthus rose (Caron and Herwood, 2007).

En base a los resultados obtenidos, se muestra que el complejo **IS** no presenta actividad antineoplásica. En contraste, los complejos [Cu(1,10-fenantrolina)(ácido glutámico)]⁺ (**AG**) y [Cu(1,10-fenantrolina)(α -metil-dopa)]⁺ (**AM**), presentan actividad similar a vinblastina, alterando la adhesión celular y rompiendo las uniones intercelulares (Matter y col., 2005; Sabanero y col., 1995). Es posible que los complejos afecten las moléculas que participan en la adhesión celular tales como proteínas de uniones intercelulares y/o proteínas de matriz extracelular (Even-Ram and Yamada, 2005). Por otra parte, la alte-

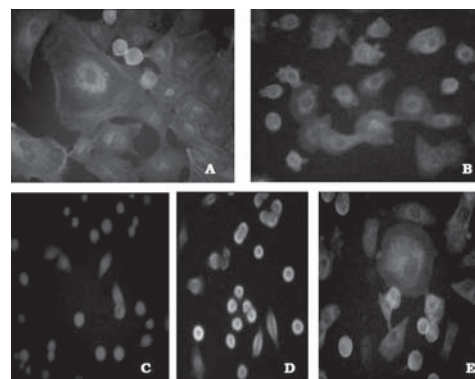


Figura 6. Citoesqueleto de microfilamentos de epitelio pulmonar expuesto a los complejos [Cu(fen)(aa's)]⁺. A) Control y expuestos a: B) Vinblastina y a los complejos C) AG, D) AM, E) IS. A y E = X600; B, C y D = X200

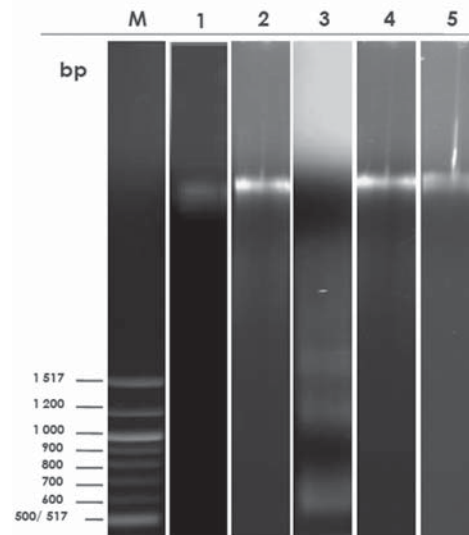


Figura 7. Análisis de DNA de células expuestas a los complejos [Cu(fen)(aa's)]⁺. Marcadores de peso molecular (M) y el DNA de los cultivos control (Carril 1), expuestos a los complejos AG (Carril 2), AM (Carril 3), IS (Carril 4) y Vinblastina (Carril 5).

ración de la red de microtúbulos y microfilamentos indica que los complejos **AG** y **AM** pueden tener como blanco la proteína tubulina o la actina, que son componentes principales de los microtúbulos y microfilamentos, estas estructuras participan en la formación del huso acromático durante la mitosis, inhibiendo así la proliferación celular; actuando de manera similar a vinblastina que afecta los microtúbulos del huso acromático (Yun-Guang y col., 2006).

Respecto a la variación cuantitativa del perfil de proteínas, es necesario hacer estudios más finos, no obstante, esta variación puede deberse a una alteración en la transcripción de genes inducida por la interacción de los complejos con el epitelio pulmonar, ya que la fenantrolina presente en los complejos se intercala en el DNA (Bodoki y col., 2008), y por lo tanto, podría alterar la expresión génica. Este resultado se ve reflejado al analizar el DNA genómico de las células expuestas a los complejos **AG** y **AM**, ya que el DNA muestra una clara degradación que puede indicar apoptosis o daño del DNA. Los resultados sugieren que el mecanismo de acción de los compuestos puede ser muy amplio y complejo, por una parte, alterando la integridad del citoesqueleto y por otra, degradando el DNA genómico; induciendo cambios moleculares y morfológicos que señalizan a la célula, posiblemente, a muerte celular por apoptosis (Mollinedo and Gajate, 2003). Sin embargo, es necesario estudiar más sobre el mecanismo de acción de los complejos organometálicos, y realizar ensayos en otros tipos celulares y en modelos animales.

CONCLUSIÓN

Los complejos de Cu (II) fenantrolina con ácido glutámico y α -metil-dopa, presentan un efecto significativo sobre la actividad celular, sugiriendo que pueden ser potencialmente, compuestos antitumorales.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a DINPO-UG., por el apoyo otorgado para la realización del proyecto con referencia 0057/05.

REFERENCIAS

- Bodoki A., Hangan A., Oprean L. y col. (2008) DNA-Binding study and nuclease activity induced by a copper (II), N, N'-bis[(4-methylphenyl)sulfonyl] ethylenediamine and 1,10-phenantroline ternary system. *Farmacía*. 6:607-614
- Caron, J.M., Herwood, M. (2007). Vinblastine, a chemotherapeutic drug, inhibits palmitoylation of tubulin in human leukemic lymphocytes. *Chemotherapy*. 53: 51-8.
- Even- Ram S. and Yamada K.M. (2005). Cell migration in 3D matrix. *Current Opinion in Cell Biol.* 17: 524-32.
- Fernández, C.S. (2005). El IMSS en Cifras; los tumores malignos en población derechohabiente, *Revista Médica del IMSS*. 43: 349-356.
- Freshney, R.A. (2000). Culture of animal cells: *A Manual of Basic Technique*. Wiley Editors, Inc., New York.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the bacteriophage T4. *Nature*. 227: 680-685.
- Lezama, R., Castillo, A., Ludueña, R.F., Meza, I. (2001). Over-expression of β 1 Tubulin in MDCK cells and incorporation of exogenous β 1 tubulin into microtubules interferes with adhesion and spreading. *Cell Motility and the Cytoskeleton*. 50: 147-160.
- Maniatis T. *Laboratory Manual*. (1990). Cold Spring Harbor Lab.
- Matter, K., Aijaz, S., Tsapara, A., Balda, M.S. (2005). Mammalian tight junctions in the regulation of epithelial differentiation and proliferation. *Current opinion in Cell Biol.* 17: 453-58.
- Mollinedo, F; Gajate, C. (2003). Microtubules, microtubule- interfering agents and apoptosis. *Apoptosis*. 8: 413- 50.
- Polo, J.J., Sabanero, M., Yamada, J.A., Segoviano, G., Mendoza, G. (2003). Synthesis, partial characterization and biological perspectives of Phenantroline Cu(II) complexes with biologically active ligands. *7th International Symposium on Applied Bioinorganic*.1: 84.
- Ruiz, G.L., Rizo, R.P., Sánchez, C.F., Osornio, V.A., García, C.C., Meneses, G.A. (2007). *Mortality due to lung cancer in Mexico*. Instituto Nacional de Cancerología de México.
- Sabanero, M., Barbosa-Sabanero, K.Y., Barbosa-Sabanero, G., Ruiz, L., Polo, J.M. (2006). Alteración en adhesión celular y el citoesqueleto por potenciales antineoplásicos. *5ª. Reunión de egresados del Instituto de Investigaciones Médicas.-1ª. Reunión de ciencias de la salud*. 64 - 66.
- Sabanero, M., González-Robles, A., Meza, I. (1985). Characterization of a 36 000-Dalton protein from the surface of Madin-Darby Canine Kidney cell involved in cell attachmen and spreading. *J. Cell biology*. 100: 2001-07.
- Yun-Guang Tong, Xiong-Wen Zhang, Mei-Yu Geng, Jian-Ming y col. (2006). Pseudolarix Acid B, a New Tubulin-Binding Agent, Inhibits Angiogenesis by Interacting with a Novel Binding Site on Tubulin. *Molecular Pharmacology*. 69:1226-1233