



## Actividad antitumoral de complejos de cobre(II) con fenantrolina y dipéptidos en células de cáncer de mama

Antitumor activity of copper(II) complexes with phenanthroline and dipeptides in cultured breast cancer cells

- » Katherine Seneth Muñoz Garzón.<sup>1,2</sup>
- » Natalia Álvarez<sup>4</sup>
- » Gianella Facchin<sup>4</sup>
- » Beatriz D. Soria<sup>2,3</sup>
- » Ana Laura Di Virgilio<sup>2,3</sup>



<sup>1</sup> Asociación Colombiana de Hematología y Oncología-ACHO. Bogotá, Colombia.

<sup>2</sup> Centro de Química Inorgánica (Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas - Universidad Nacional de La Plata)-CEQUINOR (UNLP-CONICET). La Plata, Argentina.

<sup>3</sup> Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas-CONICET. Buenos Aires, Argentina.

<sup>4</sup> Universidad de la República, Facultad de Química, Departamento Estrella Campos. Montevideo, Uruguay.

Recibido el 11 de septiembre de 2023; aceptado el 14 de abril de 2024

<https://doi.org/10.51643/22562915.667>

### Resumen

La búsqueda de terapias antitumorales no tóxicas ha aumentado, y nuevos estudios están dirigidos al desarrollo de diferentes complejos metálicos unidos a moléculas esenciales como aminoácidos. **Método:** se estudiaron dos compuestos de cobre(II) con un ligando principal como 1,10 fenantrolina (phen). El complejo [CuCl<sub>2</sub>(phen)] (1) fue estudiado en comparación a un complejo ternario con un dipéptido (resultado de la unión de dos aminoácidos como alanina y fenilalanina como ligando auxiliar) [Cu(L-Ala-Phe) (phen)]. 4H<sub>2</sub>O (2) en la línea celular de cáncer de mama humano MCF-7. **Re-sultados:** el análisis funcional mostró que ambos complejos provocan efectos antiproliferativos y de inhibición de clones, aunque ninguno de ellos presentó aumento en la producción de EROs. Por otro lado, el fenómeno de muerte celular inducido por el complejo 1 ocurre a través del proceso de necrosis, mientras que el complejo 2 provoca la inducción de apoptosis temprana. Asimismo, sólo a bajas concentraciones del complejo 2 (1 µM) encontramos quiebres dobles y simples del ADN, lo que sugiere que podría ser uno de los blancos moleculares relacionados con su actividad antitumoral. **Conclusión:** este compuesto es un candidato promisorio para posteriores estudios in vivo que demuestren ser una buena alternativa de terapia para el cáncer de mama.

**Palabras claves:** neoplasias de la mama; cobre; antineoplásicos; dipéptidos, compuestos de coordinación.

\* **Autor para correspondencia:** Ana Laura Di Virgilio. Bioquímica (UNLP), Doctora en Ciencias Naturales (Universidad Dortmund). Investigadora Independiente, CONICET; CEQUINOR, Facultad de Ciencias Exactas, UNLP Bv. 120 N 1465 (1900) La Plata, Argentina.

**Correo electrónico:** [aldivirgilio@biol.unlp.edu.ar](mailto:aldivirgilio@biol.unlp.edu.ar)

<https://doi.org/10.51643/22562915.667>

Asociación Colombiana de Hematología y Oncología. Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND. <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>

## Abstract

The search for non-toxic anti-cancer therapies has increased, allowing the development of new metal complexes linked to essential molecules such as amino acids. For this reason, two copper(II) compounds were studied with a main ligand such as 1,10 phenanthroline (phen). The complex [Cu-Cl<sub>2</sub>(phen)] (1) was studied in comparison to the ternary complex with a dipeptide (the result of the union of two amino acids such as alanine and phenylalanine as an auxiliary ligand) [Cu(L-Ala-Phe)(phen)]·4 H<sub>2</sub>O (2) in the human breast cancer cell line MCF-7. Functional analysis showed that both complexes induce antiproliferative and an effect on clone inhibition; Anyway, neither of the two complexes showed an increase in the production of EROs. On the other hand, the phenomenon of cell death induced by 1 occurs through the necrosis process, while 2 causes the induction of early apoptosis. Likewise, only at low concentrations of 2 (1 μM), we found double and single-strand DNA breaks, which suggests that it could be one of the molecular targets related to its antitumor activity. This compound is a promising candidate for further in vivo studies that prove to be a good alternative therapy for breast cancer.

**Keywords:** Breast cancer; copper; antineoplastic agents; dipeptides; coordination compounds.

## Introducción

El cáncer de mama es el tumor maligno más frecuente entre las mujeres de todo el mundo. La incidencia de cáncer de mama en Colombia y Argentina en el año 2020 fue de 15.509 y 22.024 casos por 100.000 habitantes, respectivamente, de acuerdo al reporte del Global Cancer Observatory (Globocan). Según cifras del Instituto Nacional del Cáncer, en Argentina se producen 5600 muertes anuales asociadas a esta patología. Se estima que el cáncer en el mundo tendrá un impacto creciente en las próximas décadas como producto del envejecimiento de la población, debido a la mayor expectativa de vida y a la disminución del índice de natalidad.<sup>1,2</sup>

La quimioterapia es un tipo de terapia contra el cáncer que involucra la administración de agentes químicos para destruir las células cancerígenas. Los metalofármacos son, dentro de la quimioterapia, los fármacos de uso más extendido.<sup>3</sup> En los últimos años la industria farmacológica ha realizado múltiples investigaciones sobre el uso de complejos metálicos incluyendo los de platino, cobre, zinc, paladio, galio, entre otros, demostrando actividades antitumorales

in vitro e in vivo para el tratamiento de diferentes tipos de cáncer.<sup>4</sup> El uso de estos complejos para el tratamiento del cáncer puede inducir varios procesos como la inhibición del proteosoma, apoptosis, arresto del ciclo celular, la formación de especies reactivas del oxígeno (EROs), afectación de la vía NADH o intervenir en procesos energéticos del metabolismo celular como las reacciones redox y metabolismo mitocondrial.<sup>5,6</sup>

Uno de los elementos más estudiados en la rama de la farmacología es el cobre, por ser un ion metálico de gran importancia en procesos bioquímicos. Su estructura electrónica única permite ser un cofactor en las reacciones redox de las enzimas, permitiendo el desarrollo de funciones biológicas normales. Sin embargo, se cree que la toxicidad del cobre libre surge de su participación en la producción de EROs, la cual está relacionada con la accesibilidad de ambos estados de oxidación del cobre (Cu (II) y Cu (I)).<sup>7</sup> El exceso de iones cobre se correlacionan con la progresión tumoral, la metástasis y la angiogénesis.<sup>8</sup>

Con base en estos hallazgos, comúnmente se siguen dos estrategias diferentes en el desarrollo de nuevos fármacos anticancerígenos basados en cobre: 1) secuestro de iones cobre libres en exceso mediante el uso de quelantes metálicos y, 2) síntesis de complejos de cobre que desencadenan la muerte celular mediante la acumulación del ion metálico y la inducción de la producción de EROs.<sup>9</sup>

El fenómeno de formar complejos con ligandos farmacológicamente activos con metales de transición produce una modificación de su actividad biológica, ya que transforma su entorno metálico. Además, se potencian o sinergizan los efectos del ligando libre y el ion metálico. La fenantrolina, compuesto orgánico heterocíclico nitrogenado, es uno de los ligandos más utilizados debido a la estabilización del quelato, no es tóxica y es de fácil acceso económico.<sup>10</sup> En 1979 se demostró la actividad nucleasa del complejo  $[Cu(Phen)_2]^{2+}$  y la capacidad de la fenantrolina para unirse al surco menor del ADN intercálándose en regiones ricas en adenina y timina, mientras que el ion metálico puede reaccionar con el peróxido de hidrógeno y dar origen a especies reactivas de oxígeno mediante la reacción química de Fenton, generando daños oxidativos en el ADN.<sup>11</sup>

Por otro lado, la inclusión de moléculas esenciales como aminoácidos en un complejo metálico puede mejorar la selectividad o disminuir sus efectos secundarios, lo que permite el desarrollo de terapias anticancerígenas no tóxicas.<sup>12</sup>

El objetivo de este trabajo de investigación es estudiar la actividad anticancerígena que produce un agregado de un dipéptido como ligando auxiliar a un complejo binario de cobre (II) con 1,10 fenantrolina (phen)  $[Cu(L-Ala-Phe)(phen)] \cdot 4 H_2O$  (2), comparándolo con su análogo  $[CuCl_2(phen)]$  (1) en la línea celular de cáncer de mama humano MCF-7.

## Materiales y métodos

### Materiales

Los materiales de cultivo celular se obtuvieron de Corning (Princeton, NJ, EE. UU.) y APBiotech (Buenos Aires, Argentina); el medio de cultivo Dulbecco Eagle modificado (DMEM) y TrypLE™ de Gibco (Gaithersburg, MD, EE. UU.), y el suero fetal bovino (SFB) de Internegocios S.A. (Buenos Aires, Argentina). El diacetato de 2',7'-diclodihidrofluoresceína (H2DCFDA) se obtuvo de Molecular Probes® (Eugene, Oregón, EE. UU.). La Anexina V, isotiocianato de fluoresceína (FITC), yoduro de propidio (PI), SYBR Green y la agarosa de bajo punto de fusión se compraron a Invitrogen Corporation (Buenos Aires, Argentina). La vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol) fue adquirida de Sigma Aldrich (St. Louis, MO, EE. UU.). La vitamina C (ácido ascórbico) y N-acetilcisteína (NAC) de Merck (Buenos Aires, Argentina).

Los complejos 1 y 2 empleados en este estudio fueron previamente sintetizados y caracterizados fisicoquímicamente en la Facultad de Química de la Universidad de la República, Montevideo, Uruguay. La pureza de las muestras empleadas fue confirmada a través del análisis elemental por comparación, con lo reportado recientemente para ambos compuestos.<sup>13</sup>

Análisis elemental experimental para (1): Calc. para  $CuCl_2C_{12}H_9N_2O$  0,5 PM 323,66: se encontró %C 44.53/44.11, %N 8.66/8.36, %H 2.80/2.92 y %S 0.00/0.00. Análisis elemental experimental para (2): Calc. para  $C_{24}H_{30}CuN_4O_7$ : C, 52.40, N, 10.19, H, 5.50 encontró: C, 51.85, N, 10.17, H, 5.12. Las soluciones madre frescas de ambos complejos (10 mM) se prepararon en PBS y se diluyeron con medio de cultivo según las concentraciones indicadas en la sección de resultados.

## Procedimientos

**Línea celular de cáncer de mama MCF-7 y línea celular de queratinocitos humanos HaCaT.** Se cultivó la línea celular de cáncer de mama humano (MCF-7) y la línea celular de queratinocitos humanos (HaCaT) en DMEM con 10 % de SFB, 100 UI/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomina a 37 °C en atmósfera con 5 % de CO<sub>2</sub>. Estas líneas celulares se cultivaron en una botella de 75 cm<sup>2</sup> hasta alcanzar una confluencia del 70-80 %. Para el desarrollo de los experimentos, las células se subcultivaron con TrypLETM en placas de múltiples pocillos. Después de 24 h, las monocapas se lavaron con DMEM y se agregaron los complejos en diferentes concentraciones.

**Viabilidad celular: método de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio (MTT).** El ensayo MTT es un método sensible, cuantitativo y reproducible que se basa en la medición de la viabilidad celular a través de la actividad metabólica. Se utiliza una sal de tetrazolio que mide la actividad de enzimas deshidrogenasas mitocondriales. El anillo de tetrazolio es cortado en mitocondrias activas y esta reacción solo ocurre en células viables. Se sembraron 1.5 x10<sup>4</sup> células/ml en una placa de 96 pocillos, se dejaron adherir durante 24 h y se trataron con diferentes concentraciones de 1 y 2 por 3, 6, 24 y 48 horas. Posteriormente, el medio se cambió por DMEM con 0.5 mg/ml de MTT y se incubó a 37 °C por 3 h. El cambio de color se midió por espectrofotometría en un lector de microplacas (Multiplate Reader Multiskan FC, Thermo Scientific) a 570nm después de solubilizar los cristales de formazán en 100 µl de DMSO. La viabilidad celular se representó como el porcentaje de células vivas frente al control.

Para determinar si las EROs provocaron la muerte celular, las células fueron tratadas con antioxidantes tales como una mezcla de vitaminas E y C, o N-acetilcisteína (NAC), un precursor del glutatión que confiere a la célula la capacidad de mitigar el daño intracelular. La mezcla

de vitaminas se agregó al medio de cultivo en simultáneo con los complejos. Para el caso de NAC, las células en confluencia fueron pretratadas con 250 µM de NAC durante 2 h y después el medio fue reemplazado por uno nuevo con diferentes concentraciones de los complejos. En ambos casos, la citotoxicidad fue evaluada por el método de MTT.

**Eficiencia de clonación.** Para evaluar si las células tumorales son capaces de proliferar y formar colonias tras la exposición de complejos anticancerígenos, se realizó un ensayo clonogénico. Las células MCF-7 se cultivaron en una placa de 12 pocillos hasta que alcanzaron una confluencia entre el 70-80 % y fueron tratadas con complejos 1 o 2. Como control, se cultivaron células sin fármaco durante 24 h. Se levantó la monocapa con TrypLe y se contó manualmente con coloración de azul de tripano. Las células se diluyeron y se sembraron 1.0 x10<sup>3</sup> células por pocillo en una placa de seis pozos. Luego de una incubación de 8 a 10 días, se lavaron dos veces con PBS y se tiñeron con cristal violeta durante 30 min a temperatura ambiente. Una colonia consta de al menos 20 células, las cuales se contabilizaron mediante microscopía óptica.

**Inducción de especies reactivas del oxígeno (EROs).** En los últimos años son empleadas sondas fluorescentes como la diclorodihidrofluoresceína (H<sub>2</sub>-DCF), la dihidrorodamina 123 (DHR123), MitoSox o dihidroetidio (DHE) para la determinación de EROs en tiempo real. La DHR123 es una molécula no fluorescente que por oxidación se transforma en rodamina 123 una sonda fluorescente catiónica y lipofílica (λ excitación: 500 nm; λ emisión: 530 nm). El peróxido de hidrogeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) oxida DHR123 en presencia de peroxidasas, pero también puede ser oxidada por otras especies reactivas del oxígeno como ONOO<sup>-</sup>, Fe(II), Fe(III)/ascorbato, Fe(III)/EDTA, citocromo c o OHCl.<sup>15</sup>

El DHE interactúa con varias EROs para producir etidio, un producto fluorescente. Aunque



se reporta que DHE es relativamente específico por  $O_2^{\cdot-}$  (ion superóxido)<sup>16</sup> también puede ser oxidado por una variedad de especies reactivas del oxígeno ONOO-; Fe (II)/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (ejemplo OH.); O<sub>2</sub>·; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Por lo tanto, DHE proporciona índice de producción de EROs y especies reactivas del nitrógeno (ERNs).

Las células MCF-7 fueron cultivadas en una placa de 24 pocillos, se dejaron adherir y fueron tratadas con diferentes concentraciones de los complejos 1 o 2 por 24 h. Luego, la monocapa se lavó con solución de Hanks (NaCl 0.137 M; KCl 0.8 mM; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.8 mM; CaCl<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>O 1 mM; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,4 mM; C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub> 5 mM; NaHCO<sub>3</sub> 4 mM; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.3 mM), se agregó 480 μl de solución de DHR y se dejó incubar por 30 min a 37 °C en oscuridad. Se realizó nuevamente un lavado con solución de Hanks y se lisaron las células con Triton X-100 al 0.1%. Se incubaron por 45 min a temperatura ambiente. Se analizó el producto de la oxidación de DHR<sub>123</sub> del extracto celular midiendo fluorescencia (espectro de excitación 500 nm; espectro de emisión 530 nm). Los resultados fueron corregidos por el contenido de proteínas, las cuales se midieron con el método ácido bicinconínico (BCA).

Las EROs también se cuantificaron por DHE. Se sembró 1 ml con 1.5x10<sup>5</sup> células en cada pocillo en platos de 24 y se incubó por 24 h. El procedimiento realizado fue el mismo que para la sonda anterior, pero modificando el espectro de excitación a 518 nm y el espectro de emisión a 605 nm.

**Cuantificación de proteínas por el método BCA.** La determinación de proteínas se realizó por medio del ensayo del ácido bicinconínico de acuerdo a Smith et al.<sup>17</sup> En este ensayo se reduce Cu<sup>2+</sup> a Cu<sup>+</sup> por las proteínas en un medio alcalino (reacción de Biuret), se produce un intenso color violeta como resultado de la formación de complejos entre catión cuproso y el enlace peptídico detectado por el BCA a una longitud de onda de 570 nm. De la monocapa tratada para

la detección de EROs, se tomó 25 μl de células y añadiendo 200 μl del reactivo de BCA se incubó por 20 min a 37°C. La reacción del complejo BCA-Cobre fue analizada midiendo la absorbancia en un lector de placas Multiskan FC Thermo Fisher.

**Genotoxicidad.** El ensayo Cometa es un método simple para medir daño en las cadenas del ADN en células individuales. La electroforesis a alto pH da como resultado estructuras con forma de cometa. Se realizó el procedimiento descrito por Singh et al. (1988).<sup>18</sup> Brevemente, se cultivaron 1.5x10<sup>5</sup> células/ml en placa de 12 pocillos por 24 h. La monocapa se trató con los complejos a diferentes concentraciones durante 24 h más. Como control negativo se sembraron células sin los compuestos y como control positivo se utilizó un pulso de 20 min de 10 μg/mL de bleomicina justo antes de que se recolectarán las células. Luego, se lavó con solución de PBS estéril y se levantó con TrypLe. La suspensión se colocó en tubos eppendorf, se centrifugaron a 2000 rpm a 4 °C y se descartó el sobrenadante. El pellet se resuspendió en 75 μl de agarosa de bajo punto de fusión, se agregó la solución sobre láminas que contenían agarosa de punto de fusión normal, se dejó solidificar a 4 °C por 15 min y se colocaron en solución de lisis. La electroforesis se llevó a cabo en el mismo buffer pH 12,8 por 30 min a 25 V (≈ 0,8 V/cm a través de los geles) a 4 °C. Posteriormente, los portaobjetos se neutralizaron y tñieron con Syber Green. El análisis se realizó en un microscopio de fluorescencia Olympus BX50. Un total de 100 células por punto experimental fueron analizadas para determinar el Tail Moment utilizando el software Comet Score 1.5.

**Apoptosis.** La tinción con Anexina V-FITC y yoduro de propidio (PI) se utilizó para estudiar las etapas tempranas y tardías de la apoptosis. La monocapa se trató con 1 y 2 por 24 h. Para realizar la tinción, las células se lavaron con PBS y fueron diluidas con buffer de Anexina. Para 300 μl de suspensión celular, se agregaron 1 μl de

Anexina y un 1  $\mu$ l PI (250  $\mu$ g/ml) por 20 min. Las células se analizaron usando un citómetro de flujo Becton Dickinson FACScalibur y el Flowing Software versión 2.5.1. Para cada análisis se realizó un conteo de  $1.0 \times 10^4$  eventos y se graficaron como un diagrama de puntos FSC vs. SSC. Cuatro poblaciones fueron definidas: células vivas (AnexinaV-/PI-), necróticas (AnexinaV-/PI+), apoptóticas tempranas (AnexinaV+/PI-) y apoptóticas tardías (AnexinaV+/PI+).

**Análisis estadístico.** Los resultados fueron expresados como la media de tres experimentos independientes y se representan como la media  $\pm$  el error estándar de la media (SEM). El número total de repeticiones (n) de cada experimento se indica en cada figura. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba de Tukey (ANOVA bidireccional) con el programa GraphPad Prism versión 8.0.2.

## Resultados

### Efecto sobre la viabilidad celular

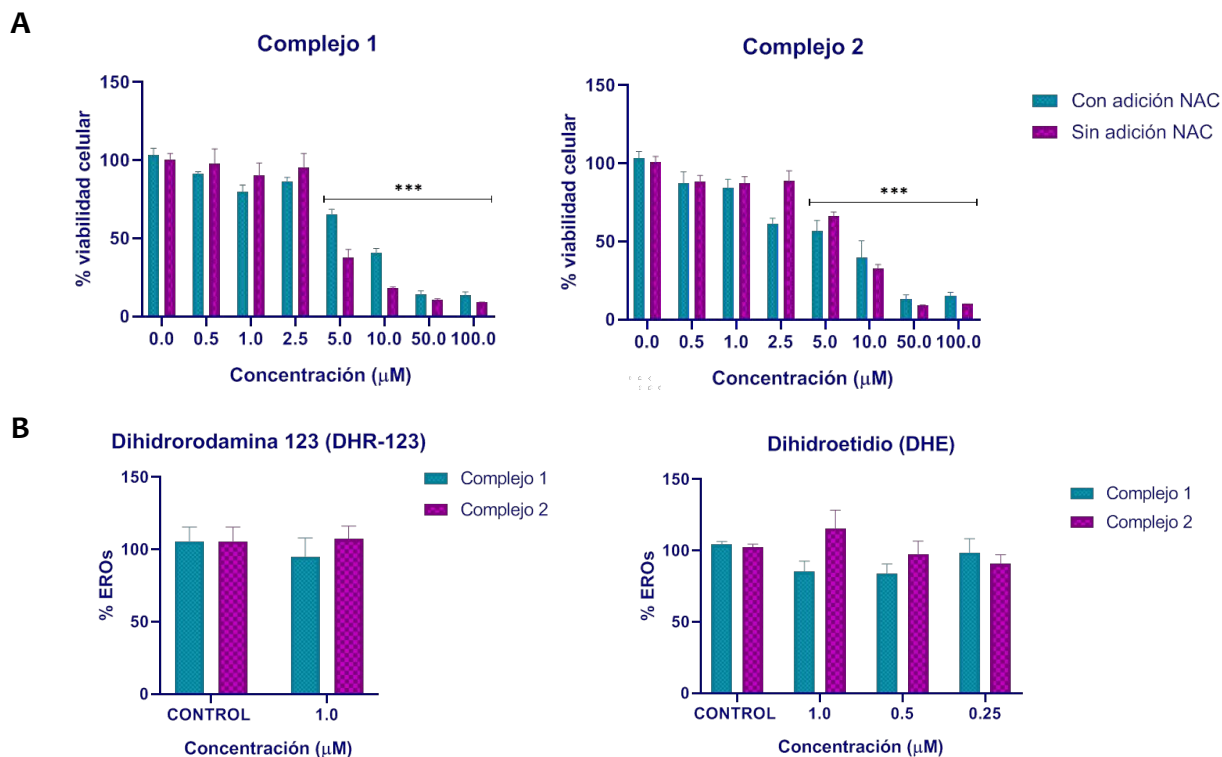
Las células de cáncer de mama (MCF-7) fueron expuestas a diferentes concentraciones de los complejos 1 y 2 por 3, 6, 24 y 48 h. Después de 3 h de tratamiento, el complejo 1 altera la viabilidad celular a partir de 10  $\mu$ M y el complejo

2 a partir de 0.5  $\mu$ M, pero en ningún caso, ésta se modifica en más del 80 %. Después de 6 h, la alteración de la viabilidad celular se hace evidente a partir de 10  $\mu$ M y 50  $\mu$ M para los tratamientos de los complejos 1 y 2, respectivamente. Cuando la exposición es de 24 h, el efecto puede observarse a partir de 5  $\mu$ M para ambos complejos (ver Figura 1), mientras que a 48 h el complejo 1 induce un efecto adverso a partir de 2.5  $\mu$ M y el complejo 2 mantiene su efecto en 5  $\mu$ M. En la Tabla 1 se muestra la concentración media inhibitoria (IC<sub>50</sub>) en 6, 24 y 48 h de exposición de los complejos 1 y 2, evidenciando que los complejos 1 y 2 en 24 h presentan IC<sub>50</sub> menores que la sal de cobre (IC<sub>50</sub> >100  $\mu$ M)<sup>19</sup> y el ligando libre (IC<sub>50</sub> 43.6 $\pm$  4.05),<sup>20</sup> lo cual indica que la coordinación de estos ligandos al cobre mejora sustancialmente el efecto del descenso en la viabilidad celular en esta línea de células tumorales. Asimismo, se demostró que el agregado de dipéptidos no mejora el efecto sobre la viabilidad celular.

La viabilidad celular de los complejos 1 y 2 también se probó en células normales de queratinocitos humanos (HaCaT) donde se observó después de 24 h de tratamiento, valores de IC<sub>50</sub> de 5.0  $\mu$ M y 3.78  $\mu$ M respectivamente, siendo el complejo 2 más tóxico para esta línea celular (ver Tabla 1).

**Figura 1.**

**A.** Efecto de la viabilidad celular en MCF-7. Las células fueron incubadas solas (control) y a diferentes concentraciones de los complejos 1 y 2 a 37°C por 24 h.  
**B.** El complejo 1 y 2 no inducen formación de especies reactivas de oxígeno (EROs) en la línea celular MCF-7 evaluados a través de la oxidación de dos sondas, dihidroetidio (DHE) (n=9) y la dihidrorodamina 123 (DHR-123) (n=6). No se observó diferencia significativa entre las dos sondas.



Nota: \*\*\* Diferencia significativa con el control (p<0.001). Influencia de la adición de N-acetil cisteína en las células MCF-7 (con NAC). No se observó diferencia significativa en los tratamientos de con y sin NAC (n=5)

**Tabla 1.**

Estudio de viabilidad celular en células MCF-7 y HaCaT por medio del ensayo MTT a diferentes tiempos de incubación.

Componente	IC <sub>50</sub> (μM)			
	MCF-7			HaCaT
	6 h	24 h	48 h	24 h
Complejo 1	8.29 ± 0.91	5.82 ± 0.77	1.38 ± 0.14	5.0 ± 0.69
Complejo 2	16.14 ± 1.20	6.74 ± 0.82	4.90 ± 0.69	3.78 ± 0.57
sal de cobre	-	> 100 <sup>19</sup>	-	-
phen	-	43.6 ± 4.05 <sup>20</sup>	-	11.68 ± 1.06
cisplatino	-	19.6 ± 1.44 <sup>20</sup>	-	24.41 ± 6.89 <sup>20</sup>

Nota: se observan los diferentes IC<sub>50</sub> en 6 h (n=6), 24 h (n=18) y 48 h (n=10) de los complejos 1 y 2, los IC<sub>50</sub> a 24 h de la sal de cobre, el ligando libre y el cisplatino en la línea celular MCF-7. Asimismo, se muestra el IC<sub>50</sub> a 24h (n=4) en las células HaCaT para los complejos 1, 2, el ligando libre y cisplatino.

## Efecto sobre el estrés oxidativo

Con el objetivo de analizar el aumento de la producción de EROs y como consecuencia la generación de estrés oxidativo celular, se procedió a medir la intensidad de los productos de oxidación (fluorescentes) de dos sondas oxidadas por distintas EROs. Tanto con DHR como con DHE se observó que la intensidad de fluorescencia normalizada por la concentración de proteínas en las células, no muestra diferencias significativas de las células tratadas con concentraciones de 0.25 a 1  $\mu\text{M}$  de los complejos 1 y 2, respecto al control. Por otro lado, tanto con el tratamiento de NAC como con la mezcla de vitaminas, se demostró que el efecto deletéreo sobre la viabilidad celular no revierte, es decir que la alteración de la viabilidad celular ejercida por

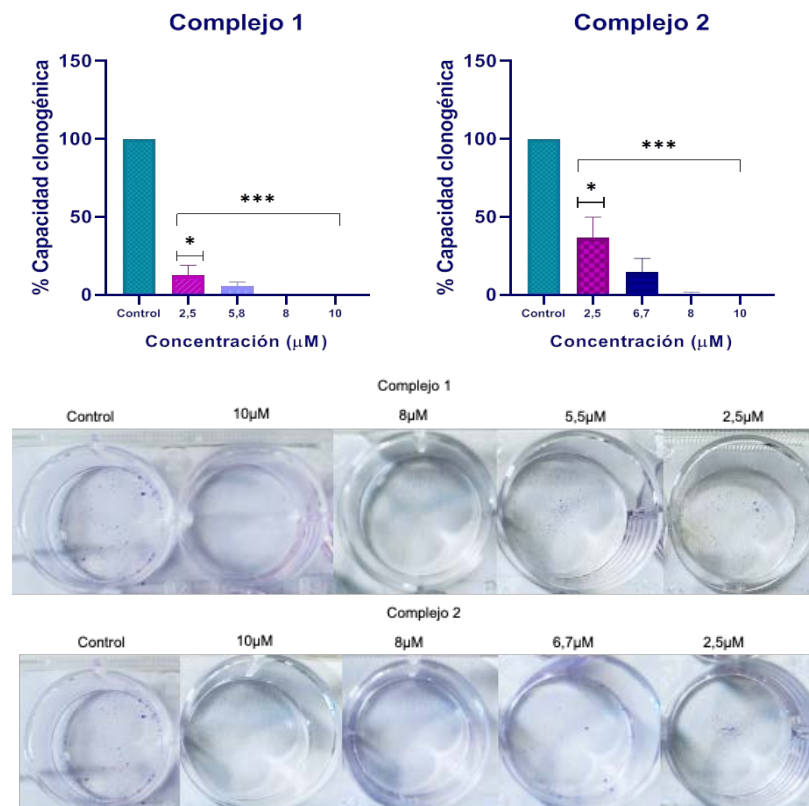
los complejos estudiados no está relacionada con la inducción de estrés oxidativo (ver Figura 1).

## Reducción de la clonogenicidad en complejos de cobre

Para determinar si los complejos tienen la capacidad de reducir la clonogenicidad de las células MCF-7, se realizó un estudio clonogénico el cual mostró una inhibición significativa de la formación de colonias a partir de la concentración 2.5  $\mu\text{M}$ . Eso es de gran importancia para la progresión tumoral y diseminación metastásica (Figura 2). Asimismo, el complejo 1 demostró alterar la capacidad clonogénica de manera más pronunciada que el complejo 2 solo a 2.5  $\mu\text{M}$ .

**Figura 2.**

Ensayo de clonogenicidad en células de cáncer mama MCF-7 a diferentes concentraciones de los complejos 1 y 2



Notas:

\*\*\* Diferencia significativa con el control ( $p < 0.001$ ).

\*Diferencia significativa entre 1 y 2 a 2.5  $\mu\text{M}$  ( $p < 0.05$ ) ( $n=4$ ).



### Genotoxicidad

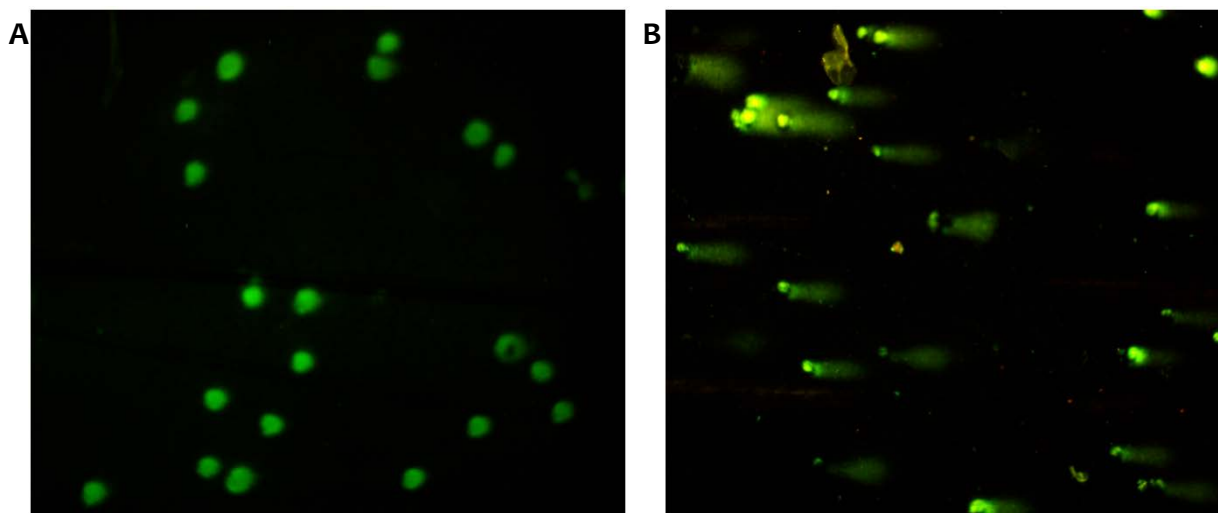
El ensayo Cometa o electroforesis de una sola célula fue empleado para determinar roturas simples y dobles de ADN y sitios apurínicos. Las

células tumorales fueron expuestas a concentraciones menores al IC<sub>50</sub> de ambos complejos (0.5 y 1 µM). En las Figuras 3 y 4, se puede observar la inducción del daño al ADN cuando las células MCF-7 se expusieron a 1 µM del complejo 2.

**Figura 3.**

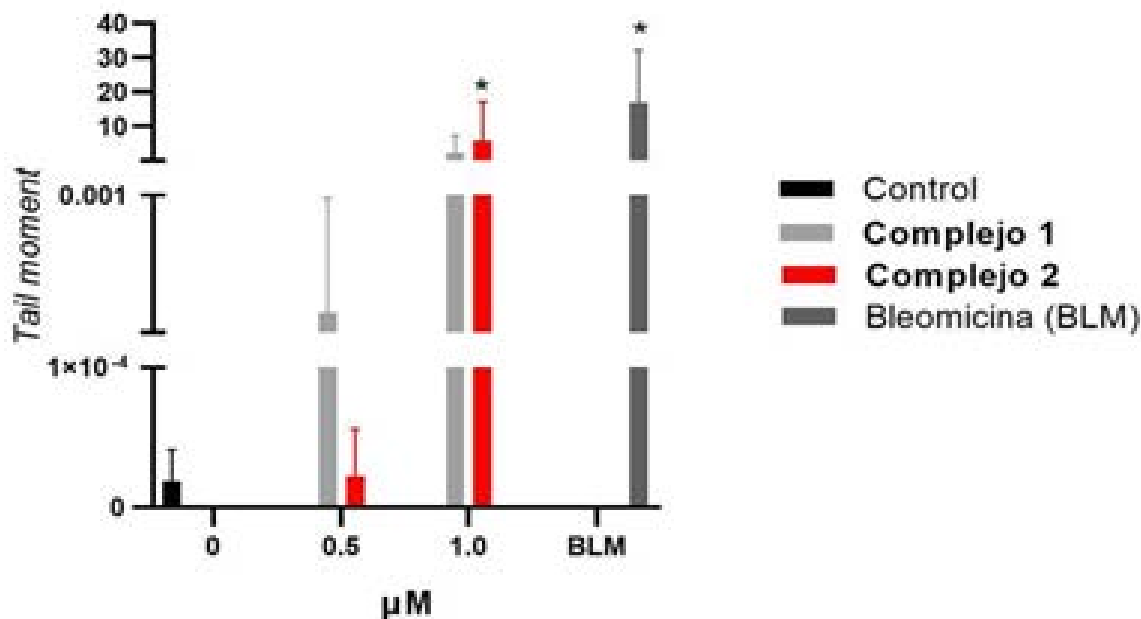
Inducción de Genotoxicidad inducida por el complejo 2 en células MCF7.

**A)** células MCF-7 no tratadas (control negativo), **B)** células MCF-7 tratadas con 1 µM del complejo 2.



**Figura 4.**

Cuantificación del Ensayo Cometa en células MCF-7. Los resultados se expresan como el promedio con SD (n=100). \*Diferencia significativa con el control (p<0.01).



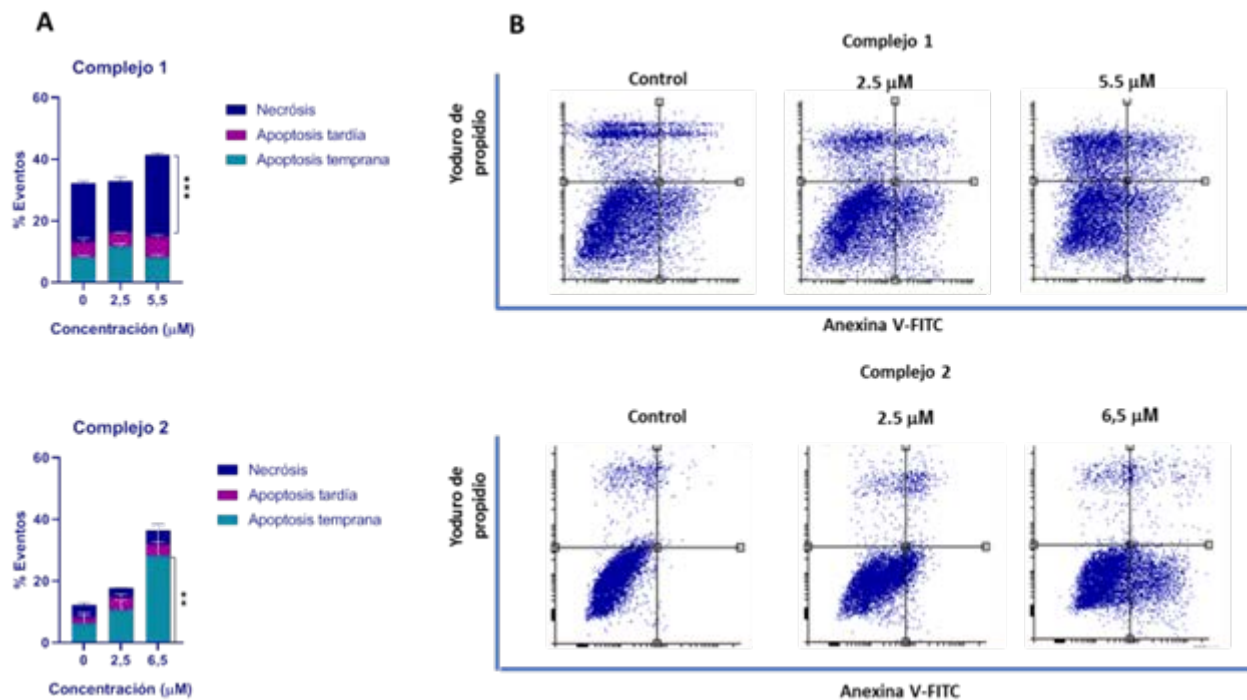
## Apoptosis

La apoptosis es la muerte celular programada que desempeña un papel fundamental en diferentes vías bioquímicas y genéticas permitiendo el desarrollo normal de las células. En condiciones de estrés, daño en puntos de control en el ciclo celular o presencia de lesiones tumorales, la activación de este proceso permite la eliminación de células dañadas o bloquear un proceso de carcinogénesis.<sup>21</sup> La apoptosis se evidencia en cambios morfológicos como la condensación del núcleo y citoplasma, pérdida de la simetría de membrana y daños en el ADN,<sup>22</sup> o al presentar modificaciones bioquímicas como la externalización de la fosfatidilserina en la membrana

plasmática externa.<sup>23</sup> La fosfatidilserina ofrece sitios de unión a la Anexina V-FITC permitiendo su detección por fluorescencia.

Con la exposición a 5.5  $\mu\text{M}$  del complejo 1 se observó un aumento -en comparación al control- de la fracción AnexinaV-/PI+, sugiriendo que el complejo no activa vías de apoptosis, sino que la muerte celular ocurre por inducción de necrosis. El complejo 2 por su parte, a una concentración de 6.5  $\mu\text{M}$  provocó en el 15 % de la población celular un aumento en la fracción Anexina V+/PI, lo cual sugiere la activación de muerte celular por apoptosis. Estos hallazgos se evidencian en la Figura 5.

**Figura 5.** A. Determinación de apoptosis por medio de tinción con Anexina V-FITC y yoduro de propidio en células MCF-7 tratadas con 1 o 2 durante 24 h. Los resultados se expresan como el promedio con la desviación estándar del error (SEM) (n=3). B. Diagrama Dot Plot del análisis por citometría de flujo de las células MCF-7 tratadas por 24 h con 1 o 2. El eje X (FL1) corresponde a la marcación con yoduro de propidio y en el eje Y (FL2) se relaciona la población celular marcada con Anexina V-FITC.



**Notas:** Asteriscos indican diferencia significativa con el control

\*\* ( $p < 0.05$ ) y

\*\*\* ( $p < 0.001$ ).

## Discusión

El cáncer de mama es uno de los tres tipos de cáncer más común en el mundo. La mayoría de los cánceres de mama son no metastásicos al momento del diagnóstico y son debido a formaciones fibroquísticas. Entre de los tumores malignos existen varios tipos, según el lugar de la mama donde se produzca el crecimiento anormal de las células y su estadio. Los más frecuentes son: carcinoma ductal invasivo, carcinoma lobular invasivo y carcinoma medular.<sup>24</sup>

La quimioterapia es un tipo de terapia contra el cáncer que involucra la administración de agentes químicos para destruir las células cancerígenas. Los metalofármacos son, dentro de la quimioterapia, los fármacos de uso más extendidos,<sup>25</sup> después del descubrimiento de la actividad antiproliferativa del cis-diaminodichloroplatino(II),  $\text{cis-[Pt (NH}_3)_2\text{Cl}_2]$  en 1968.

Numerosas publicaciones describen la capacidad de algunos complejos de cobre(II) para interferir selectivamente con el mecanismo de la división celular.<sup>26-28</sup> Esta estrategia es utilizada para desarrollar nuevos fármacos que inhiban la proliferación tumoral. Por esta razón, nuestro objetivo es encontrar compuestos capaces de superar a los utilizados en los tratamientos de quimioterapias actuales mediante el estudio de los efectos antitumorales de complejos ternarios de cobre(II) con diferentes aminoácidos como ligandos auxiliares.

Ambos complejos estudiados reducen la viabilidad de las células MCF-7 después de 6, 24 y 48 h de exposición. Con un tratamiento de 24 h ambos complejos muestran un efecto más fuerte que el cisplatino en células MCF-7 (IC<sub>50</sub> de  $19.6 \pm 1.44 \mu\text{M}$ ), siendo 1 y 2 casi 4 veces menor que el cisplatino.<sup>20,23</sup> Por otro lado, considerando los valores de IC<sub>50</sub>, observamos que el complejo 1 disminuye la viabilidad celular más fuertemente que el complejo 2 (indicando que

la adición del dipéptido no mejora el efecto anti-tumoral en este complejo). A 24 h los valores de IC<sub>50</sub> son similares. Asimismo, el complejo 2 presenta mejor desempeño con un IC<sub>50</sub> menor de  $5 \mu\text{M}$  que complejos con alanina reportados en otros estudios con IC<sub>50</sub> alrededor de  $60 \mu\text{M}$ .<sup>29</sup> Además, la alanina podría incrementar significativamente estas actividades antiproliferativas, como se observó en un estudio de Heinrich et al. (2021) en células de cáncer de colon y cáncer de pulmón de células no pequeñas. Incluso, el dipéptido compuesto por  $\beta$ -alanina y L-histidina, posee propiedades antiinflamatorias y antioxidantes y la capacidad para modular la proliferación celular, la detención del ciclo celular y la apoptosis, relacionado con la actividad antitumoral descrita a nivel preclínico en cáncer de mama.<sup>30</sup>

La acción de estos complejos también se observó en la eficiencia clonogénica, ya que disminuyeron el crecimiento clonal aislado a concentraciones de  $2.5 \mu\text{M}$  y no hubo formación de clones a concentraciones de  $10 \mu\text{M}$ . Este efecto es evidente a concentraciones más bajas que la observada para el ensayo de viabilidad celular ( $5 \mu\text{M}$ ). Este ensayo resultó más sensible que el ensayo MTT. De igual manera, fue descrito para metotrexato e inhibidores del dihidrofolato reductasa en células MCF-7.<sup>31</sup>

Una estrategia utilizada comúnmente en el desarrollo de nuevos medicamentos contra el cáncer a base de cobre es la síntesis de complejos que desencadenan la muerte celular a través de la acumulación del ion metálico y la inducción de la producción de EROs. Este fenómeno ocurre a través de la catálisis de reacciones de oxidación-reducción.<sup>9</sup> Dado que las células cancerígenas presentan un elevado estado oxidativo, es que son más vulnerables al aumento de los niveles de EROs.<sup>32,33</sup>

Los complejos de cobre(II) con fenantrolina y dipéptidos estudiados no inducen el aumento

de los niveles de EROs en MCF-7 determinados por DHR123 y DHE, ni el detrimento de la viabilidad celular revierte después del tratamiento con una mezcla de vitaminas o NAC, lo que sugiere que el estrés oxidativo no es el mecanismo de acción de estos complejos. Sin embargo, el complejo de cobre(I)  $[\text{Cu}(\text{phen})_2]^+$  es capaz de dañar oxidativamente el ADN, actuando así como una nucleasa artificial.<sup>34</sup>

Un amplio espectro de complejos de cobre demostró que su acción antitumoral es multifactorial. Tanto la intercalación en el ADN como la inhibición de topoisomerasa llevan a la fragmentación del ADN y a la inducción de la apoptosis, así como la inhibición del proteosoma.<sup>35,28</sup> Nuestros resultados demuestran que solo el complejo 2 a 1  $\mu\text{M}$  ejerce un efecto genotóxico comparable al control positivo. Este efecto puede vincularse a la unión del surco y/o a la intercalación del complejo al ADN. Previamente, se demostró que el complejo 2 presenta una interacción a través de la unión del surco e intercalación parcial, que puede ocurrir a través de la intercalación parcial de la fenantrolina y del anillo aromático de la Phe.<sup>13</sup>

Se describió una estructura intercalada estable para  $[\text{Cu}(\text{phen})(\text{H}_2\text{O})_3]^{2+}$  y que la molécula de agua coordinada apicalmente permanece en el surco sin ninguna interferencia particular con la unión intercalada. Los complejos ternarios de Cu(II)  $[\text{Cu}(\text{phen})(\text{AA})]^{2+}$  (AA = aminoácidos) sufren una disociación parcial en  $[\text{Cu}(\text{phen})(\text{H}_2\text{O})_3]^{2+}$  y el aminoácido libre en el ADN. La relación entre la cantidad del complejo ternario intacto y la forma tris-aqua en el ADN depende de la naturaleza del aminoácido. Por ejemplo, los complejos ternarios de L-lisina, L-arginina y L-glutamina apenas se disocian en el ADN y su modo de unión al ADN es intercalado.<sup>36</sup>

Las células tienen un mecanismo de autodestrucción para mantener la homeostasis biológica y defenderse de agentes patógenos o de células tumorales; este proceso es conocido como

muerte celular regulada (MCR). Sin embargo, se ha observado que las células tumorales tienen mecanismos de resistencia como la evasión de la apoptosis. Por esto, varios estudios se han centrado en otras vías de MCR como la necroptosis, piroptosis, oncosis, ferroptosis y cuproptosis.<sup>37,38</sup>

En este estudio, observamos que el complejo 1 a una concentración de 5.5  $\mu\text{M}$ , no provocó un aumento significativo de poblaciones de Anexina-FITC que se unieran a la fosfatidilserina en la membrana plasmática, en cambio, presentó aumento en poblaciones (AnexinaV-/PI+) demostrando actividad necrótica. Esto indica que posiblemente no activan la vía de la apoptosis, sino que podrían activar vías como la oncosis por la destrucción masiva del material genético, en donde enzimas reparadoras de ADN como la poliADP ribosa polimerasa (PARP), agota su sustrato NAD imposibilitando su función y con ello llevando a una muerte celular por necrosis. Este efecto también fue descrito para otros metalofármacos.<sup>39</sup>

Por otro lado, el complejo 2 provocó un aumento en las poblaciones (AnexinaV+/PI-) que revela su capacidad de inducir apoptosis. Estudios de metalodrogas con aminoácidos indican una alta frecuencia de muerte celular por este mecanismo, posiblemente por la acción del aminoácido en el interior de la célula, que es capaz de internalizarse y producir inestabilidad genómica.<sup>40,41</sup> Este efecto de los aminoácidos se debe a la alta expresión del transportador ASCT2 (ASC-amino ácido transportador 2) que está en las células cancerígenas,<sup>42</sup> y sobreexpresado especialmente en MCF-7.<sup>43,44</sup> Lo que sugiere que complejos unidos con dipéptidos ingresen a las células tumorales más fácilmente a través de este transportador.

## Conclusión

En conclusión, se estudiaron dos complejos

de cobre(II) con 1,10-fenantrolina (phen) como ligando principal y uno de ellos conteniendo además un dipéptido como ligando auxiliar en células de cáncer de mama MCF-7. Ambos complejos poseen menores IC<sub>50</sub> que el cis-Pt, lo que resulta de gran importancia para futuros estudios *in vivo* a fin de descubrir nuevos compuestos para emplear en terapias contra el cáncer. Sin embargo, solo el complejo 2 provocó inducción de apoptosis y un aumento de los quiebres simples y dobles en el ADN, demostrado a través del ensayo Cometa. Además, la disminución de la viabilidad celular en esta línea de cáncer de mama parece no estar relacionada con los niveles de especies reactivas del oxígeno, lo que indicaría que su mecanismo de acción está ligado a la interacción y daño del ADN.

### Agradecimientos

Este trabajo fue financiado por la Universidad Nacional de La Plata-UNLP (PID 2020/2023 X899), el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas-CONICET (PIP 0235), la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica-ANPCyT (2021-GRF-TII-00090) y convenio de apoyo institucional con la Asociación Colombiana de Hematología y Oncología-ACHO para rotación extramural en el exterior y estudios de postgrado en hematología y oncología.

### Aspectos éticos

Este artículo no contiene ningún estudio practicado en animales o participantes humanos.

### Conflictos de interés

Los autores del artículo hacen constar que no existe ningún tipo de conflicto de intereses financieros, académicos o personales que puedan poner en peligro la validez de lo comunicado.

### Colaboraciones

Katherine Seneth Muñoz, Ana Laura Di Virgilio colaboraron en la concepción y diseño del estudio, adquisición de datos, análisis de los resultados y la escritura del manuscrito.

Natalia Álvarez colaboró en la adquisición de datos y análisis de los resultados.

Gianella Facchin colaboró en la adquisición de datos, análisis de los resultados y revisión crítica del contenido intelectual del manuscrito.

Beatriz D. Soria colaboró en la revisión crítica del contenido intelectual del manuscrito.

### Biografía de autores

Katherine Seneth Muñoz. Bacterióloga - Morfóloga, especialista en gerencia de calidad. Estudiante de PhD en ciencias biológicas UNLP-Argentina. Miembro ACHO - Becaria CONICET; CEQUINOR (CONICET-UNLP) Bv120 N1465 e 60 y 64, La Plata, Argentina.

Natalia Álvarez. Doctora en Química y Licenciada en Química, Universidad de la República. Departamento Estrella Campos, Facultad de Química, Universidad de la República. Área de Química Inorgánica, DEC, Facultad de Química Gral. Flores 2124, Montevideo, Uruguay.

Gianella Facchin. Doctora en Química y Química Farmacéutica Universidad de la República. Departamento Estrella Campos, Facultad de Química, Universidad de la República. Área de Química Inorgánica, DEC, Facultad de Química Gral. Flores 2124, Montevideo, Uruguay.

Beatriz D. Soria. Licenciada en Química, Doctora en Química. Investigadora Independiente, CONICET; CEQUINOR (CONICET-UNLP) Bv120 N1465 e 60 y 64, La Plata, Argentina.



Ana Laura Di Virgilio. Bioquímica (UNLP), Doctora en Ciencias Naturales, Universidad Dortmund. CEQUINOR, Facultad de Ciencias Exactas, UNLP. Investigadora Independiente, CONICET; CEQUINOR (CONICET-UNLP) Bv120 N1465 e 60 y 64, La Plata, Argentina.

## Referencias

1. Global Cancer Statistics 2020: Cancer fact sheets -Estimates of Incidence and Mortality Argentina. GLOBOCAN [Internet]. 2021[citado 05 de mayo de 2023];1-2. Disponible en: <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/32-argentina-fact-sheets.pdf>
2. Global Cancer Statistics 2020: Cancer fact sheets -Estimates of Incidence and Mortality Colombia. GLOBOCAN [Internet]. 2021[citado 05 de mayo de 2023];1-2. Disponible en: <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/170-colombia-fact-sheets.pdf>.
3. Lucaciu RL, Hangan AC, Sevastre B, Oprean LS. Metallo-Drugs in Cancer Therapy: Past, Present and Future. *Molecules* [Internet]. 2022; 27(19):6485. Disponible en: <https://doi.org/10.3390/molecules27196485>
4. Zhang Z, Wang H, Yan M, Wang H, Zhang C. Novel copper complexes as potential proteasome inhibitors for cancer treatment (Review). *Mol Med Rep* [Internet]. 2017 Jan 1;15(1):3–11. Disponible en: <https://doi.org/10.3892/mmr.2016.6022>.
5. Laws K, Bineva-Todd G, Eskandari A, Lu C, O'Reilly N, Suntharalingam K. A Copper (II) Phenanthroline Metallopeptide That Targets and Disrupts Mitochondrial Function in Breast Cancer Stem Cells. *Angew Chem Int Ed Engl* [Internet]. 2018 Jan 2;57(1):287–291. Disponible en: <https://doi.org/10.1002/anie.201710910>.
6. Anthony EJ, Bolitho EM, Bridgewater HE, Carter OWL, Donnelly JM, Imberti C, Lant EC, Lermyte F, Needham RJ, Palau M, Sadler PJ, Shi H, Wang FX, Zhang WY, Zhang Z. Metallo-drugs are unique: opportunities and challenges of discovery and development. *Chem Sci* [Internet]. 2020 Nov 12;11(48):12888–12917. Disponible en: <https://doi.org/10.1039/d0sc04082g>.
7. De Luca A, Barile A, Arciello M, Rossi L. Copper homeostasis as target of both consolidated and innovative strategies of anti-tumor therapy. *J Trace Elem Med Biol* [Internet]. 2019 Sep;55:204–213. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2019.06.008>.
8. Blockhuys S, Wittung-Stafshede P. Roles of Copper-Binding Proteins in Breast Cancer. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2017 Apr 20;18(4):871. Disponible en: <https://doi.org/10.3390/ijms18040871>
9. Denoyer D, Masaldan S, La Fontaine S, Cater MA. Targeting copper in cancer therapy: ‘Copper That Cancer’. *Metallomics* [Internet]. 2015 Nov;7(11):1459–76. Disponible en: <https://doi.org/10.1039/c5mt00149h>.
10. Efremov Ivanov M. Síntesis de fenantrolinas funcionalizadas y complejos de cobre(I). [dissertation]. [España]: Universidad de Valladolid. 2021.51.
11. Mc Givern TJP. Multi-functional Copper(II) Drug Candidates as Potential Anti-Cancer Agents [PhD Thesis]. [Dublin]; Royal College of Surgeons in Ireland; 2016.
12. Prihantono, Irfandi R, Raya I, Warsinggih. Potential anticancer activity of Mn (II) complexes containing arginine dithiocarbamate ligand on MCF-7 breast cancer cell lines. *Ann Med Surg (Lond)* [Internet]. 2020 Nov 11;60:396–402. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.amsu.2020.11.018>.
13. Iglesias S, Alvarez N, Torre MH, Kremer E, Ellena J, Ribeiro RR, Barroso RP, Costa-Filho AJ, Kramer MG, Facchin G. Synthesis, structural characterization and cytotoxic activity of ternary copper(II)-dipeptide-phenanthroline complexes. A step towards the development of new copper compounds for the treatment of cancer. *J Inorg Biochem* [Internet]. 2014 Oct;139:117–23. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2014.06.007>.
14. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for

- cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* [Internet]. 1983 Dec 16;65(1-2):55-63. Disponible en: [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4).
15. Fernández-Blanco C. Estudios in vitro de los mecanismos de toxicidad de las micotoxinas. [dissertation] [Valencia (PA)]: Universidad de Valencia; 2017. 416.
  16. Martínez-Pastor F, Mata-Campuzano M, Alvarez-Rodríguez M, Alvarez M, Anel L, de Paz P. Probes and techniques for sperm evaluation by flow cytometry. *Reprod Domest Anim* [Internet]. 2010 Jun;45 Suppl 2:67-78. Disponible en: <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2010.01622.x>.
  17. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* [Internet]. 1985 Oct;150(1):76-85. Disponible en: [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(85\)90442-7](https://doi.org/10.1016/0003-2697(85)90442-7). Erratum in: *Anal Biochem* 1987 May 15;163(1):279.
  18. Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* [Internet]. 1988 Mar;175(1):184-91. Disponible en: [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(88\)90265-0](https://doi.org/10.1016/0014-4827(88)90265-0).
  19. Li DD, Yagüe E, Wang LY, Dai LL, Yang ZB, Zhi S, Zhang N, Zhao XM, Hu YH. Novel Copper Complexes That Inhibit the Proteasome and Trigger Apoptosis in Triple-Negative Breast Cancer Cells. *ACS Med Chem Lett* [Internet]. 2019 Jul 25;10(9):1328-1335. Disponible en: <https://doi.org/10.1021/acsmedchemlett.9b00284>.
  20. Thornton L, Dixit V, Assad LO, Ribeiro TP, Queiroz DD, Kellett A, Casey A, Colleran J, Pereira MD, Rochford G, McCann M, O'Shea D, Dempsey R, McClean S, Kia AF, Walsh M, Creaven B, Howe O, Devereux M. Water-soluble and photo-stable silver(I) dicarboxylate complexes containing 1,10-phenanthroline ligands: Antimicrobial and anticancer chemotherapeutic potential, DNA interactions and antioxidant activity. *J Inorg Biochem* [Internet]. 2016 Jun;159:120-32. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio>.
  21. Hassan M, Watari H, AbuAlmaaty A, Ohba Y, Sakuragi N. Apoptosis and molecular targeting therapy in cancer. *Biomed Res Int* [Internet]. 2014;2014:150845. Disponible en: <https://doi.org/10.1155/2014/150845>. Epub 2014 Jun 12. Retraction in: *Biomed Res Int* [Internet]. 2020 Aug 28;2020:2451249.
  22. Cadavid Vargas JF. Screening de metalofármacos derivados de N-heterociclos y metales de transición en cultivos celulares 2D y 3D según sus efectos antitumorales. [PhD Thesis]. [Argentina]; Universidad de la Plata. 2019
  23. Balsa LM, Ruiz MC, Santa Maria de la Parra L, Baran EJ, León IE. Anticancer and antimetastatic activity of copper (II)-tropolone complex against human breast cancer cells, breast multicellular spheroids and mammospheres. *J Inorg Biochem* [Internet]. 2020 Mar; 204:110975. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2019.110975>.
  24. Waks AG, Winer EP. Breast Cancer Treatment: A Review. *JAMA* [Internet]. 2019 Jan 22;321(3):288-300. Disponible en: <https://doi.org/10.1001/jama.2018.19323>.
  25. Ding C, Tong L, Feng J, Fu J. Recent Advances in Stimuli-Responsive Release Function Drug Delivery Systems for Tumor Treatment. *Molecules* [Internet]. 2016 Dec 20;21(12):1715. Disponible en: <https://doi.org/10.3390/molecules21121715>.
  26. Bousourani Z, Katsamakos S, Geromichalos GD, Psycharis V, Raptopoulou CP, Hadjipavlou-Litina D, Yiannaki E, Dendrinou-Samara C. Synthesis, structure elucidation and biological evaluation of triple bridged dinuclear copper(II) complexes as anticancer and antioxidant/anti-inflammatory agents. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* [Internet]. 2017 Jul 1;76:1026-1040. Disponible en: doi: <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.03.157>.
  27. Oliveri V, Lanza V, Milardi D, Viale M, Maric I, Sgarlata C, Vecchio G. Amino- and chloro-8-hydroxyquinolines and their copper complexes as proteasome inhibitors and

- antiproliferative agents. *Metallomics* [Internet]. 2017 Oct 18;9(10):1439-1446. Disponible en: <https://doi.org/10.1039/c7mt00156h>.
28. Esteban León I, Fernando Cadavid-Vargas J, Laura Di Virgilio A, Beatriz Etcheverry S. Vanadium, Ruthenium and Copper Compounds: A New Class of Non-platinum Metallodrugs with Anticancer Activity. *Curr Med Chem* [Internet]. 2016;23:1-37. Disponible en: <https://doi.org/10.2174/0929867323666160824162546>
  29. Heinrich J, Bossak-Ahmad K, Riisom M, Haeri HH, Steel TR, Hergl V, Langhans A, Schattschneider C, Barrera J, Jamieson SMF, Stein M, Hinderberger D, Hartinger CG, Bal W, Kulak N. Incorporation of  $\beta$ -Alanine in Cu(II) ATCUN Peptide Complexes Increases ROS Levels, DNA Cleavage and Antiproliferative Activity. *Chemistry* [Internet]. 2021 Dec 23;27(72):18093-18102. Disponible en: <https://doi.org/10.1002/chem.202102601>.
  30. Maugeri S, Sibbitts J, Privitera A, Cardaci V, Di Pietro L, Leggio L, Iraci N, Lunte SM, Caruso G. The Anti-Cancer Activity of the Naturally Occurring Dipeptide Carnosine: Potential for Breast Cancer. *Cells* [Internet]. 2023 Nov 8;12(22):2592. Disponible en <https://doi.org/10.3390/cells12222592>.
  31. H. F, Zarghi A, Kobarfard F, Zendehdel R, Nakhjavani M, Arfaiee S, et al. Remarks in Successful Cellular Investigations for Fighting Breast Cancer Using Novel Synthetic Compounds. *Breast Cancer - Focusing Tumor Microenvironment, Stem cells and Metastasis*. InTech [Internet]; 2011. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.5772/23005>
  32. Zhang Z, Bi C, Schmitt SM, Fan Y, Dong L, Zuo J, Dou QP. 1,10-Phenanthroline promotes copper complexes into tumor cells and induces apoptosis by inhibiting the proteasome activity. *J Biol Inorg Chem* [Internet]. 2012 Dec;17(8):1257-67. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s00775-012-0940-x>.
  33. Gałczyńska K, Drulis-Kawa Z, Arabski M. Antitumor Activity of Pt(II), Ru(III) and Cu(II) Complexes. *Molecules* [Internet]. 2020 Jul 31;25(15):3492. Disponible en <https://doi.org/10.3390/molecules25153492>
  34. Sigman DS, Graham DR, D'Aurora V, Stern AM. Oxygen-dependent cleavage of DNA by the 1,10-phenanthroline cuprous complex. Inhibition of *Escherichia coli* DNA polymerase I. *J Biol Chem* [Internet]. 1979 Dec 25;254(24):12269-72. Disponible en: [https://www.jbc.org/article/S0021-9258\(19\)86305-6/pdf](https://www.jbc.org/article/S0021-9258(19)86305-6/pdf)
  35. Cadavid-Vargas JF, Villa-Pérez C, Ruiz MC, León IE, Valencia-Urbe GC, Soria DB, Etcheverry SB, Di Virgilio AL. 6-Methoxyquinoline complexes as lung carcinoma agents: induction of oxidative damage on A549 monolayer and multicellular spheroid model. *J Biol Inorg Chem* [Internet]. 2019 Mar;24(2):271-285. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s00775-019-01644-7>.
  36. Chikira M, Ng CH, Palaniandavar M. Interaction of DNA with Simple and Mixed Ligand Copper(II) Complexes of 1,10-Phenanthrolines as Studied by DNA-Fiber EPR Spectroscopy. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2015 Sep 21;16(9):22754-80. Disponible en: <https://doi.org/10.3390/ijms160922754>.
  37. Gong Y, Fan Z, Luo G, Yang C, Huang Q, Fan K, Cheng H, Jin K, Ni Q, Yu X, Liu C. The role of necroptosis in cancer biology and therapy. *Mol Cancer* [Internet]. 2019 May 23;18(1):100. Disponible en: <https://doi.org/10.1186/s12943-019-1029-8>
  38. Tong X, Tang R, Xiao M, Xu J, Wang W, Zhang B, Liu J, Yu X, Shi S. Targeting cell death pathways for cancer therapy: recent developments in necroptosis, pyroptosis, ferroptosis, and cuproptosis research. *J Hematol Oncol* [Internet]. 2022 Dec 8;15(1):174. Disponible en: <https://doi.org/10.1186/s13045-022-01392-3>.
  39. Ortega-Forte E, Hernández-García S, Vígueras G, Henarejos-Escudero P, Cutillas N, Ruiz J, Gandía-Herrero F. Potent anticancer activity of a novel iridium metallodrug via oncosis. *Cell Mol Life Sci* [Internet]. 2022 Sep 6;79(10):510. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s00775-022-01392-3>

- org/10.1007/s00018-022-04526-5.
40. de Sousa IH, Campos VNS, Vale AAM, Maciel-Silva VL, Leite CM, Lopes AJO, Mourão PS, das Chagas Alves Lima F, Batista AA, de Azevedo Dos Santos APS, Almeida MAP, Pereira SRF. Ruthenium (II) complexes with N, O-chelating proline and threonine ligands cause selective cytotoxicity by the induction of genomic instability, cell cycle arrest and apoptosis in breast and prostate tumor cells. *Toxicol In Vitro* [Internet]. 2020 Feb;62:104679. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2019.104679>.
41. Lima AP, Pereira FC, Almeida MA, Mello FM, Pires WC, Pinto TM, Delella FK, Felisbino SL, Moreno V, Batista AA, de Paula Silveira-Lacerda E. Cytotoxicity and apoptotic mechanism of ruthenium(II) amino acid complexes in sarcoma-180 tumor cells. *PLoS One* [Internet]. 2014 Oct 17;9(10):e105865. Disponible en: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0105865>.
42. Wang Q, Holst J. L-type amino acid transport and cancer: targeting the mTORC1 pathway to inhibit neoplasia. *Am J Cancer Res* [Internet]. 2015; 15. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4473310/pdf/ajcro005-1281.pdf>
43. Shennan DB, Thomson J, Gow IF, Travers MT, Barber MC. L-leucine transport in human breast cancer cells (MCF-7 and MDA-MB-231): kinetics, regulation by estrogen and molecular identity of the transporter. *Biochim Biophys Acta* [Internet]. 2004 Aug 30;1664(2):206-16. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.bbame.2004.05.008>.
44. Liu Y, Zhao T, Li Z, Wang L, Yuan S, Sun L. The role of ASCT2 in cancer: A review. *Eur J Pharmacol* [Internet]. 2018 Oct 15;837:81-87. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2018.07.007>.