



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

## Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

“Compuestos organometálicos de hierro y rutenio como posibles agentes antitumorales para el glioblastoma”

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
Maestro en Ciencias

PRESENTA:

LUIS JAVIER MERINO VÁZQUEZ

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Salvador Uribe Carvajal  
[Instituto de Fisiología Celular, UNAM](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Daniela Araiza Olivera Toro  
[Instituto de Química, UNAM](#)

Dr. Juan Pablo Pardo Vázquez  
[Facultad de Medicina, UNAM](#)

Ciudad de México. Agosto, 2022



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## **1 Agradecimientos**

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada durante la realización de este proyecto.

Gracias al apoyo del laboratorio 305-Oriente del Instituto de Fisiología Celular bajo la dirección del Dr. Salvador Uribe Carvajal y la asesoría técnica de la Dra. Natalia Chiquete Félix y del Dr. Emilio Espinoza Simón.

A mi comité tutorial, la Dra. Daniela Araiza Olivera Toro y al Dr. Juan Pablo Pardo Vázquez que me brindaron su valioso tiempo y enseñanzas.

A mis amigos, Alan, Mayra y Sam, ha sido un gusto coincidir con ustedes.

Finalmente agradezco al Laboratorio de Biomacromoléculas I del Instituto de Química, tanto del Dr. José Federico del Río Portilla, de la Dra. Nuria Esturau Escofet, como de la M. en C. María Teresa Obdulia Ramírez Apan.

## 2 Dedicatoria

*A mi familia, amor y apoyo incondicional, lo mejor de este mundo.*

*A Andrea, lo mejor que el universo formó.*

### 3 **Tabla de contenido**

|      |  |    |
|------|--|----|
| 1    | Agradecimientos.....   | 1  |
| 2    | Dedicatoria .....  | 2  |
| 3    | Tabla de contenido .....   | 3  |
| 4    | Índice de Figuras .....  | 6  |
| 5    | Índice de Tablas .....   | 7  |
| 6    | Abreviaturas .....   | 8  |
| 7    | Resumen.....   | 10 |
| 8    | Abstract .....   | 11 |
| 9    | Introducción .....   | 12 |
| 10   | Cáncer .....   | 12 |
| 11   | Carcinogénesis y Biología del Cáncer.....                                      | 13 |
| 12   | Clasificación del Cáncer.....  | 14 |
| 12.1 | Carcinoma .....  | 14 |
| 12.2 | Sarcoma.....   | 14 |
| 12.3 | Leucemia.....  | 14 |
| 12.4 | Mieloma y linfoma.....   | 14 |
| 12.5 | Cerebro y médula espinal.....  | 14 |
| 13   | Tumores del Sistema Nervioso Central (SNC) .....                               | 15 |
| 14   | Tumores primarios del SNC.....   | 15 |
| 14.1 | Meningiomas.....   | 16 |
| 14.2 | Ependimomas .....  | 16 |
| 14.3 | Meduloblastomas .....  | 16 |
| 14.4 | Neuroblastomas.....  | 16 |
| 14.5 | Gliomas .....  | 16 |
| 15   | Glioblastoma o Astrocitoma grado IV .....                                      | 19 |
| 16   | Origen celular del glioblastoma .....  | 22 |
| 17   | Metabolismo desregulado de glioblastomas.....                                  | 23 |
| 18   | Especies Reactivas de Oxígeno (ROS) en glioblastoma .....                      | 26 |
| 19   | Migración, proliferación y evasión de la muerte celular de glioblastomas ..... | 27 |
| 20   | Epidemiología del glioblastoma.....  | 31 |
| 21   | Terapias actuales para glioblastomas .....                                     | 34 |
| 22   | Organometales: Metalocenos y compuestos sándwich .....                         | 35 |
| 23   | Compuestos organometálicos de rutenio.....                                     | 35 |
| 24   | Compuestos organometálicos de ferroceno.....                                   | 36 |

|         |  |    |
|---------|--|----|
| 25      | Selenoderivados: Ferrocenilselenoamida y rutenocilselenoamida.....   | 42 |
| 26      | Planteamiento del Problema.....  | 43 |
| 27      | Hipótesis.....   | 43 |
| 28      | Objetivos .....  | 43 |
| 28.1    | Objetivo general .....   | 43 |
| 28.2    | Objetivos Particulares .....   | 44 |
| 28.2.1  | Comprobar la capacidad citotóxica de los compuestos organometálicos en líneas celulares de glioblastoma. ....  | 44 |
| 28.2.2  | Realizar ensayos de migración y proliferación en células donde los compuestos hayan tenido actividad antitumoral. ....   | 44 |
| 28.2.3  | Medir la concentración intracelular de ROS después de la exposición a los compuestos.....  | 44 |
| 28.2.4  | Evaluar el efecto de los fármacos en el metabolismo celular y cuantificar lactato, glutamina y glutamato generados por enzimas clave en la tumorigénesis del glioblastoma. ... | 44 |
| 28.2.5  | Analizar el posible mecanismo de muerte por el que actúan las moléculas organometálicas.....   | 44 |
| 29      | Materiales y Métodos .....   | 45 |
| 29.1    | Cultivo celular .....  | 45 |
| 29.2    | Determinación de la viabilidad celular a través el ensayo de MTT .....   | 45 |
| 29.3    | Migración celular .....  | 46 |
| 29.4    | Proliferación celular .....  | 46 |
| 29.5    | Tinción con cristal violeta.....   | 47 |
| 29.6    | Metabólica.....  | 47 |
| 29.7    | Metabolitos extracelulares.....  | 47 |
| 29.8    | Metabolitos intracelulares .....   | 48 |
| 29.9    | Análisis de RMN.....   | 48 |
| 29.10   | Análisis de Componentes Principales (PCA).....   | 48 |
| 29.11   | Análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales (PLS-DA) .....   | 49 |
| 29.12   | Cuantificación de Especies Reactivas de Oxígeno.....   | 49 |
| 29.12.1 | Peróxido de Hidrogeno H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....  | 49 |
| 29.12.2 | Determinación de anión superóxido.....   | 50 |
| 29.13   | Determinación de lactato.....  | 50 |
| 29.14   | Determinación de glutamina y glutamato .....   | 51 |
| 29.15   | Western blot .....   | 52 |
| 30      | Resultados .....   | 53 |
| 30.1    | Citotoxicidad de los compuestos organometálicos. ....  | 53 |

|        |   |    |
|--------|---|----|
| 30.2   | Ensayo de la ferrocenilselenoamida en la migración celular .....  | 56 |
| 30.3   | Proliferación celular en presencia de la ferrocenilselenoamida .....  | 60 |
| 30.4   | Participación de la ferrocenilselenoamida en el metabolismo celular.....  | 61 |
| 30.5   | Diferencia en la producción de lactato en presencia del compuesto organometálico .....                                      | 67 |
| 30.6   | Cambios en la concentración de glutamina y glutamato extracelular .....   | 69 |
| 30.7   | Contribución de las especies reactivas de oxígeno en la citotoxicidad. ....   | 70 |
| 30.7.1 | Medición de peróxido de hidrógeno.....  | 70 |
| 30.7.2 | Determinación del anión superóxido.....   | 72 |
| 30.8   | La molécula de ferrocenilselenoamida reduce la expresión de marcadores proliferativos y muestra inducción de apoptosis..... | 73 |
| 31     | Discusión.....  | 75 |
| 32     | Conclusiones .....  | 82 |
| 33     | Perspectivas.....   | 83 |
| 34     | Referencias .....   | 84 |

## 4 Índice de Figuras

|   |    |
|---|----|
| Figura 1 Hallmarks adquiridos por células tumorales para el crecimiento y progresión tumoral.                                       | 12 |
| Figura 2 Tomografía computacional y tomografía por Resonancia Magnética Nuclear de glioblastoma                                     | 17 |
| Figura 3. Supervivencia relativa por grupo de edades y por grado de tumor   | 18 |
| Figura 4. Patogénesis genética y molecular del glioblastoma   | 20 |
| Figura 5. Metabolismo desregulado tumoral; utilización e ingesta de nutrientes en células de glioma                                 | 25 |
| Figura 6. Transición Epitelio-Mesénquima en células de Glioma.  | 29 |
| Figura 7. Rangos de incidencia y mortalidad de cáncer a nivel mundial en 2018 para ambos sexos y edades                             | 31 |
| Figura 8. Porcentaje de Tumores del SNC, malignos y no malignos..   | 31 |
| Figura 9. Supervivencia de pacientes con tumores astrocíticos   | 32 |
| Figura 10. Rangos de incidencia y mortalidad de cáncer en México en el 2018   | 33 |
| Figura 11. Organometales con actividad biológica a base de Ferroceno.   | 38 |
| Figura 12. Bioisosterismo del Ferroceno.  | 39 |
| Figura 13. Compuestos heterometálicos con Ferroceno con blancos multimodales  | 39 |
| Figura 14. Compuesto multimetálico de Platino y Ferroceno   | 40 |
| Figura 15. Ferroceno como antena en metaloquimioterapia fotoactivada  | 41 |
| Figura 16. Compuesto trimetálico de Zinc y Ferroceno  | 41 |
| Figura 17. Compuesto con centro de Platino y Ferroceno  | 42 |
| Figura 18. Ensayo de viabilidad   | 55 |
| Figura 19. Cuantificación de migración celular  | 57 |
| Figura 20. Monitoreo fotográfico de la migración celular en la línea no tumoral   | 58 |
| Figura 21. Monitoreo de migración celular en línea celular tumoral.   | 59 |
| Figura 22. Cuantificación de la proliferación celular en ambas líneas celulares   | 60 |
| Figura 23. Espectros de RMN realizados a las células U251 del medio Extracelular a 72H  | 63 |
| Figura 24. Espectros de RMN realizados a las células U251 del medio Intracelular a 72H  | 63 |
| Figura 25. Espectros de RMN realizados a las células HEK293 del medio Intracelular a 72H  | 64 |
| Figura 26. Espectros de RMN realizados a las células HEK293 del medio Extracelular a 72H  | 64 |
| Figura 27. Análisis de espectros de HEK293 por RMN en Metaboanalyst.  | 65 |
| Figura 28. Análisis de espectros de U251 por RMN en Metaboanalyst..   | 66 |
| Figura 29. Determinación de niveles de lactato extracelular en ambas líneas celulares   | 68 |
| Figura 30. Cambios en la concentración de glutamato y glutamina extracelular en la línea celular tumoral U251..                     | 70 |
| Figura 31. Medición de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> en ambas líneas celulares  | 71 |
| Figura 32. Determinación de anión superóxido.   | 72 |
| Figura 33. La molécula de Ferrocenilselenoamida reduce la expresión de marcadores de proliferación y muestra inducción de apoptosis | 74 |
| Figura 34. Modelo propuesto para la actividad de la ferrocenilselenoamida   | 81 |



## 5 Índice de Tablas

|   |    |
|---|----|
| Tabla 1. Tumores primarios comunes agrupados según Benignidad y Malignidad        | 15 |
| Tabla 2. Frecuencia de genes mutados en glioblastoma                              | 21 |
| Tabla 3. Ensayo de viabilidad y cálculo de $IC_{50}$ en Diversas Líneas Celulares | 55 |

## 6 Abreviaturas

ACS: Sociedad de Cáncer Americana  
AKT: Proteína Cinasa B  
ALL: Leucemia Linfoblástica Aguda  
ARF: Proteína de Marco de Lectura Alternativo  
ASCT2: Transportador 2 de Cisteína, Serina y Alanina  
EAAT2: Transportador de Aminoácidos Excitatorios  
ECM: Matroz extracelular  
EGF: Factor de Crecimiento Epidermal  
EGFR: Receptor del Factor de Crecimiento Epidermal  
EMT: Transición Epitelio Mesénquima  
GABRA1: subunidad alfa-1 del receptor tipo A del ácido  $\gamma$ -aminobutírico  
Gys: Gray  
HEK293: Células Embrionarias de Riñón Humano 293  
HeLa: Células Humanas de Cáncer Cervicouterino  
IDH: Isocitrato Deshidrogenasa  
INNN: Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía  
LDH: Lactato Deshidrogenasa  
LN229: Células de Glioblastoma Humano  
LOH: Pérdida de heterocigosidad  
MAPK: Proteína de Cinasas Activada por Mitógenos  
MCT: Transportador de Monocarboxilato  
MTT: Ensayo de Bromuro 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5 difenil tetrazolio  
NADH: Nicotinamida Adenina Dinucleótido  
Neuro-2a: Línea celular de neuroblastoma de ratón de rápido crecimiento  
NSC: Células Troncales Neurales  
OMS: Organización Mundial de la Salud  
OPC: Células Precursoras de Oligodendrocitos  
P53: Proteína supresora de tumores  
PBS: Amortiguador de fosfato salino  
PDGF: Factor de crecimiento derivado de plaquetas  
PDGFR: Receptor del Factor de crecimiento derivado de plaquetas  
PK: Proteína Cinasa

PTEN: Fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato-3-fosfatasa

RMN: Resonancia Magnética Nuclear

RTK: Receptor Tirosina Cinasa

ROS: Especies Reactivas de Oxígeno

SKLU1: Células de Cáncer Pulmonar Humano

SLC: Transportadores de Solutos

SNC: Sistema Nervioso Central

SOD: Superóxido dismutasa

TC: Tomografía computacional

TNF: Factor de Necrosis Tumoral

TNFR: Receptor del Factor de necrosis Tumoral

TSP: Solución de Fosfatos Trisódica

U251: Células de Glioblastoma Humano

## 7 Resumen

Los gliomas son el grupo principal de tumores cerebrales primarios y normalmente se les conoce así por que surgen de células de la glía. El tipo de tumor más común entre ellos es el glioblastoma o astrocitoma grado IV el cual representa cerca del 50% de los tumores cerebrales malignos, este tipo de neoplasias puede surgir tanto *de novo*, mayoritariamente, como de una progresión lenta de astrocitomas de niveles inferiores. Los glioblastomas a su vez pueden subclasificarse según sus perfiles de transcripción en proneural, neural, clásico y mesenquimal.

A nivel mundial esta patología tiene una incidencia de 3.5 personas por cada 100 mil habitantes, cifra muy aproximada para México la cual es de 2.7 por cada 100 mil habitantes; desafortunadamente, la gran mayoría de personas que presenta esta enfermedad fallece debido a que los tratamientos por elección con temozolomida, cirugía, radiación, etc., no resultan efectivos pues la media de supervivencia una vez diagnosticada esta enfermedad es de 15 meses.

En este tipo de neoplasias, las alteraciones metabólicas juegan un papel crucial en el desarrollo de la enfermedad, al igual que su invasividad y su supervivencia, gracias a múltiples mutaciones, cambios epigenéticos y diversos cambios que estas células tumorales presentan. Desgraciadamente, aún no se cuentan con terapias efectivas, especialmente quimioterapéuticas, para dar un panorama más favorable para aquellos pacientes que la presentan. El equipo de Gutiérrez Fernández et al, sintetizó moléculas a base de hierro, rutenio y selenio como posibles agentes citotóxicos. En este proyecto se analizó el efecto de la molécula de ferrocenilselenoamida en mecanismos clave para la supervivencia tumoral en líneas de glioblastoma humano U251; utilizando como control no tumoral a las células HEK293. Los resultados mostraron que la molécula, afecta negativamente la viabilidad, la proliferación y la migración celular. Además, gracias a ensayos enzimáticos, esta molécula promovió cambios en metabolitos clave en la progresión tumoral como lo son el lactato, glutamina y glutamato. Asimismo, generó cambios en la concentración de  $H_2O_2$ , aunque la concentración de  $O_2^{\cdot-}$  se mantuvo constante. Finalmente se efectuó un análisis de nivel de expresión proteica, por medio de Wester blot, en diversas vías clave que se ven alteradas en la línea celular tumoral, observándose una disminución en las proteínas Bcl-2,  $\beta$ -Catenina, PTEN y p-ERK y un aumentó la expresión de la caspasa 3 sugiriendo muerte celular vía apoptosis.

## 8 Abstract

Gliomas are the main group of primary tumors in the brain and normally they arise from glial cells. The most common type of tumor among them is grade IV glioblastoma or astrocytoma, which represents about 50% of malignant brain tumors. This type of neoplasm can arise both *de novo*, mostly, and from a slow progression of a lower-level astrocytoma. Glioblastomas are subclassified according to their transcription profiles as proneural, neural, classical, and mesenchymal.

Worldwide, this pathology has an incidence of 3.5 people per 100,000 people, a similar figure for Mexico, which is 2.7 per 100,000 people; Unfortunately, most people with this disease die because the elective treatments as temozolomide, surgery, radiation, etc., are not effective, since the average survival once this disease is diagnosed is 15 months.

Within this type of neoplasia, metabolic alterations play a crucial role in the development of disease, as well as its invasiveness and survival rate, due to multiple mutations, epigenetic, and various changes that these tumor cells present. Regrettably, there are still no effective therapies, especially chemotherapy, to provide a more favorable outlook for those patients who present this type of neoplasia.

Gutiérrez Fernández' group, synthesized molecules based on iron, ruthenium, and selenium as a possible cytotoxic agent. In this project, the effect of the ferrocenylselenoamide molecule on key mechanisms for tumor survival in human glioblastoma lines U251 was analyzed, using HEK293 cells as non-tumor control. These results showed that molecule negatively affects cell viability, proliferation, and migration. In addition, due to enzymatic assays, this molecule promoted changes in key metabolites in tumor progression such lactate, glutamine, and glutamate. Likewise, this molecule generated changes in  $H_2O_2$  concentration, but  $O_2^-$  remained constant. Finally, level of protein expression analysis was carried out, with Western blot, in several key pathways that are altered in this tumor cell line, observing a decrease in the Bcl-2,  $\beta$ -Catenin, PTEN and p-ERK proteins. and an increased expression of caspase 3, suggesting cell death via apoptosis.

## 9 Introducción

## 10 Cáncer

El cáncer es una amplia colección de enfermedades relacionadas entre sí, teniendo en común la división descontrolada celular y la dispersión de estas células a tejidos circundantes (Institute, 2020). Esta enfermedad es el resultado de una serie de mutaciones genéticas, muchas de ellas generadas en diversas vías de señalización, las cuales controlan procesos celulares como la transcripción de genes, la progresión del ciclo celular, sobrevivencia y apoptosis. El conjunto de todas estas características genera una transformación maligna, un incremento de la proliferación y de la resistencia a la muerte celular (Hanahan & Weinberg, 2011).

Hanahan & Weinberg en el 2011 trataron de racionalizar la complejidad de las neoplasias generando así, 10 características que todos los tumores comparten. (Figura 1).

Las características o *hallmarks* que establecieron son las siguientes: Señalización proliferativa sostenida; evasión de supresores de crecimiento; metástasis e invasión activa; inmortalidad replicativa; inducción de angiogénesis; resistencia a la muerte celular; inflamación promovida por el tumor; evasión de la respuesta inmune; inestabilidad y mutación genómica y desregulación energética celular.

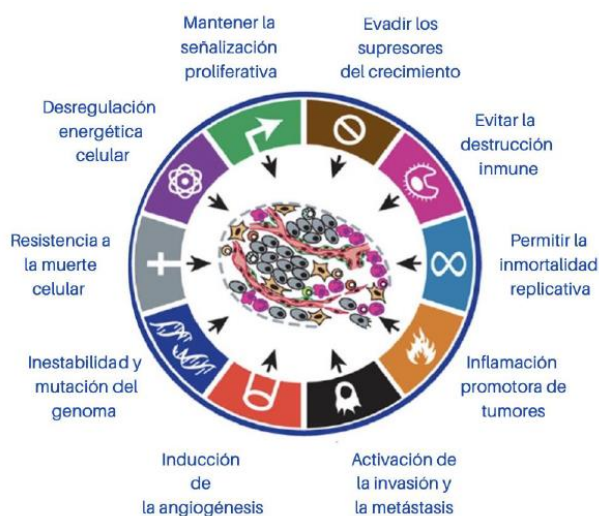


Figura 1 Capacidades o hallmarks adquiridos por células tumorales para el crecimiento y progresión tumoral, modificada de Hanahan & Weinberg, 2011.

La proliferación celular descontrolada y crónica que representa parte de la esencia del cáncer, está estrechamente relacionada con un ajuste en el metabolismo energético celular que promueve el crecimiento y la división celular continua. Un claro ejemplo de esto es la generación de lactato por medio de la glucólisis aun en presencia de oxígeno, también llamado efecto Warburg. Aunque contradictorio en términos de eficiencia energética (~18 veces menor), comparado con la fosforilación oxidativa, esta vía glucolítica suele estar muy activa en el cáncer (Finley & Thompson, 2015). Se ha observado que el lactato impulsa la progresión del cáncer, al aumentar la angiogénesis, la migración, el escape a la respuesta inmunitaria, y la acidosis extracelular. Es así como cambios o desregulaciones en el metabolismo celular, o en algún otro *hallmark* favorecen el proceso carcinogénico de esta enfermedad (San-millán & Brooks, 2017; Vander Heiden, 2011)

## **11 Carcinogénesis y Biología del Cáncer**

El desarrollo del cáncer o carcinogénesis es un proceso lento y multifacético. Este proceso puede ser dividido conceptualmente en cuatro etapas las cuales son: iniciación, promoción, conversión maligna y progresión tumoral. Cada etapa tendrá influencia sobre la generación de nuevas poblaciones celulares.(Calabi & Milstein, 2000; Jaouen et al., 2015; Pedarzani & Stocker, 2008).

De manera general, la primera etapa consta de un daño genético irreversible, por lo regular causado por un carcinógeno, pudiendo implicar cambios epigenéticos. Esto generará una acumulación de mutaciones en las células que propiciará la proliferación y supervivencia tumoral. La segunda etapa comprende la expansión clonal de las células que ya están iniciadas, lo que causará una heterogeneidad en el tumor, pues a mayor cantidad de divisiones celulares el nivel de mutaciones en estas células aumentará, dando paso a la conversión maligna que es el proceso por el cual las células preneoplásicas comienzan a expresar un fenotipo maligno y en donde los cambios genéticos son de suma importancia para la última fase. (Serrano Cardona & Muñoz Mata, 2013) En la última etapa, las células adquieren las propiedades más agresivas, por ejemplo, la expresión de fenotipos malignos, expresión de proteínas que degradan la matriz extracelular, inestabilidad genética, crecimiento descontrolado, entre otras.(Pedarzani & Stocker, 2008).

## 12 Clasificación del Cáncer

Existen muchos tipos de cáncer y se han tratado de catalogar de dos maneras: 1) Por el tipo de tejido en el cual se origina el cáncer (histológica) y 2) Por la ubicación donde este se desarrolló en el cuerpo, también llamado sitio primario.

De acuerdo con su histología se clasifican en 5 categorías principales, las cuales a su vez cuentan con distintas subcategorías. Dichas categorías son 1) carcinoma; 2) sarcoma; 3) leucemia 4) mieloma; y linfoma; y 5) cerebro y médula espinal.

### 12.1 Carcinoma

Neoplasia maligna que proviene de tejido epitelial. Este tipo de cáncer es el responsable de al menos el 80% de todos los casos de cáncer. Ejemplo de esto son aquellos que afectan los tejidos como la piel, pulmón, colon, próstata, vejiga, entre otros.

### 12.2 Sarcoma

Este término se refiere a aquel cáncer que surge de tejidos conectivos, como los huesos, tendones, cartílago músculo y grasa. Dentro de esta categoría encontramos al osteosarcoma, fibrosarcoma, liposarcoma, etc.

### 12.3 Leucemia

Se refiere a aquel cáncer que surge a partir de la médula ósea. Es caracterizado por una sobreproducción de glóbulos blancos inmaduros, por lo cual estas células no desarrollarán bien su función, generando que el paciente sea propenso a tener infecciones.

### 12.4 Mieloma y linfoma

Cánceres del sistema linfático. Son cánceres no epiteliales que comprenden diversos tipos de células del sistema inmunitario, incluyendo el linaje linfoide (linfocitos B y T)

### 12.5 Cerebro y médula espinal

Son aquellos tumores no epiteliales que surgen de células cerebrales o de la médula espinal. Juntos, el cerebro y la médula espinal forman el sistema nervioso central. Esta categoría y sus subcategorías



se profundizarán a continuación. (Ries et al., 2007; Serrano Cardona & Muñoz Mata, 2013; Song et al., 2015).

### 13 Tumores del Sistema Nervioso Central (SNC)

Los tumores cerebrales, también llamados tumores intracraneales, son una masa anormal de tejido, donde las células crecen y se multiplican incontrolablemente. Según la Asociación Americana de Neurocirujanos (AANS por sus siglas en inglés), hay más de 150 diferentes tumores que han sido documentados, pero los dos grupos principales de tumores cerebrales están clasificados como metastásicos y primarios.

Cánceres sistémicos como de pulmón, mama, piel y riñón, frecuentemente hacen metástasis al cerebro. Al contrario de los tumores primarios, los metastásicos están típicamente bien delineados, y pueden ser identificados por su diferente apariencia celular durante una autopsia o basado en la biopsia del tejido. (Sontheimer & Sontheimer, 2015; Takei et al., 2016).

Estos tipos de tumores alcanzan al cerebro vía circulación sanguínea, y se sabe que invaden tejido cerebral circundante. Además, suelen encontrarse en el parénquima cerebral, donde 80% de ellos crecen en los hemisferios, 15% en el cerebelo y un 5% en el tronco encefálico. (Sontheimer & Sontheimer, 2015).

### 14 Tumores primarios del SNC

En los tumores primarios se incluyen tumores que se originan de tejidos del cerebro o del entorno inmediato al cerebro. Estos tipos de tumores están divididos en malignos o benignos, y cada grupo tiene sus diferentes subtipos. (Sontheimer & Sontheimer, 2015) Tabla 1.

*Tabla 1. Tumores primarios comunes agrupados según benignidad y malignidad. Modificada de Sontheimer & Sontheimer, 2015.*

| Tumores cerebrales primarios  |   |
|---|---|
| Benigno   | Maligno   |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• Meningioma</li> <li>• Adenoma hipofisario</li> <li>• Neuroma acústico</li> <li>• Tumor epidermoide</li> <li>• Papiloma del plexo coroideo</li> <li>• Epenimoma</li> <li>• <b>Astrocitoma pilocítico</b></li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Astrocitoma</b></li> <li>• <b>Astrocitoma anaplástico</b></li> <li>• <b>Giloblastoma multiforme</b></li> <li>• <b>Oligodendroglioma</b></li> <li>• <b>Oligodendro-atrocitoma</b></li> <li>• Carcinoma del plexo coroideo</li> <li>• Tumores pineales</li> <li>• Meduloblastoma</li> </ul> |

#### 14.1 Meningiomas

Tumores que crecen entre el cráneo y el cerebro, específicamente en la estructura tipo membrana, llamada meninges, es el tumor primario más común. La gran mayoría son no invasivos y pueden ser retirados quirúrgicamente en la mayoría de los pacientes. Aproximadamente representan el 37 % de todos los tumores intracraneales. (Lee & Lee, 2020).

#### 14.2 Ependimomas

Son tumores que surgen a partir de células que delimitan los ventrículos. Normalmente crecen en el espacio ventricular y desplaza al fluido cerebroespinal. Representan el 5% de los tumores del SNC en los niños, la mayoría es curable tras cirugía y radiación. (Sontheimer & Sontheimer, 2015).

#### 14.3 Meduloblastomas

Son las neoplasias más comunes en infantes pues representan el 10% de todos los tumores del SNC en niños. Surgen de células progenitoras neurales en el cerebelo. Son tumores malignos que requieren de máxima resección y una radiación y quimioterapia agresiva. Este tratamiento está asociado con una morbilidad significativa especialmente en pacientes jóvenes. (Lakhani, 2019).

#### 14.4 Neuroblastomas

Aunque está implicado en su nombre, típicamente no representan tumores del SNC, pero son los tumores sólidos extracraneales más comunes en niños. Se originan a partir de células progenitoras de la cresta neural, por lo tanto, pueden surgir en todo lo largo del sistema nervioso simpático. Las modalidades del tratamiento incluyen simple observación, resección quirúrgica, quimioterapia, radioterapia e inmunoterapia. (Sontheimer & Sontheimer, 2015).

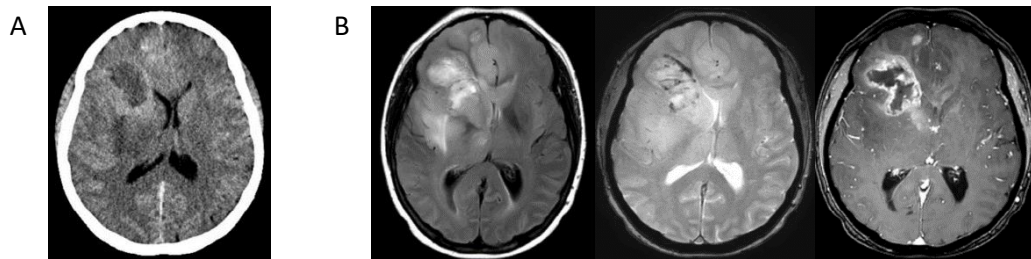
#### 14.5 Gliomas

El grupo más grande de tumores cerebrales primarios, estos comprenden a los astrocitomas, oligodendrogliomas, y glioblastomas. Normalmente se les conoce como gliomas por que comparten un origen glial. Los gliomas representan un tercio de todos los tumores primarios y corresponden a

un 80% de todos los tumores cerebrales primarios malignos. (Shergalis et al., 2018; Sontheimer & Sontheimer, 2015).

Los gliomas son generados por múltiples mutaciones en genes que controlan el crecimiento celular y diferenciación, además abarcan un gran grupo de tumores que han sido clasificados según características histológicas. Estos tumores los podemos dividir en dos grandes grupos, aquellos que son difusos y no difusos; los primeros se caracterizan por tener un crecimiento altamente infiltrativo hacia los alrededores del parénquima y el segundo es todo lo contrario, estos tumores carecen de la propiedad de infiltración. (Mesfin 2019; Wesseling & Capper, 2018).

Los tumores difusos se presentan con mayor frecuencia que los tumores no difusos, y en esta subclasificación, se encuentran los oligodendrogliomas y los glioblastomas. Este último es el tipo de tumor maligno más común y frecuente y además el que mayor importancia clínica representa. (Mesfin, 2019). La detección de gliomas se realiza por métodos no invasivos, típicamente por tomografía computacional (TC), (Figura 2A), para identificar la masa tumoral y posteriormente se realizan imágenes por resonancia magnética nuclear (RMN), (Figura 2B), para contrastar y potenciar las imágenes obtenidas por TC. Los gliomas se presentan como hipodensos, lesiones muy brillantes en TC e imágenes RMN donde el tumor está rodeado por un edema. (İşin et al., 2016; Shukla et al., 2017).



*Figura 2 Tumor de Glioblastoma A) Imagen tomada por tomografía computacional (TC). B) Imágenes tomadas por Resonancia Magnética Nuclear (RMN). Las imágenes son del mismo paciente. Modificada de Shukla et al., 2017*

A nivel histológico, la Organización Mundial de la Salud, clasifica a los gliomas del tipo I al IV. Esta clasificación se basa en las características patológicas del tumor: apariencia celular, atipia nuclear, actividad mitótica, formación de nuevos vasos sanguíneos (neovascularización) y evidencia de tejido muerto (necrosis). La presencia de al menos 3 de estas 5 características, representan al tumor más maligno y de rápido crecimiento, el tipo IV o glioblastoma multiforme: el cual tiene presencia de alta tasa de actividad mitótica y necrosis. La presencia de nuevos vasos sanguíneos reduce la media de

esperanza de vida de 5 a 3 años, y la presencia de células mitóticas, la reduce a solo 1 año. (Fulling & Garcia, 1985).

Si solamente hay presencia de 2 de las características mencionadas con anterioridad, que frecuentemente son la atipia nuclear y la actividad mitótica, se clasifica el tumor como tipo o grado III. Los tumores de grado más bajo regularmente no presentan actividad mitótica, pero sí la atipia celular o nuclear. (Sontheimer & Sontheimer, 2015).

Este tipo de clasificación es muy importante, sirve tanto al paciente como al médico, pues ofrece un valor predictivo de la progresión de la enfermedad, así como de la esperanza de vida. Esta se verá comprometida conforme a la edad del paciente, la evolución de los tumores de grados inferiores a grados más malignos y la localización cerebral (Figura 3) (Ries et al., 2007).

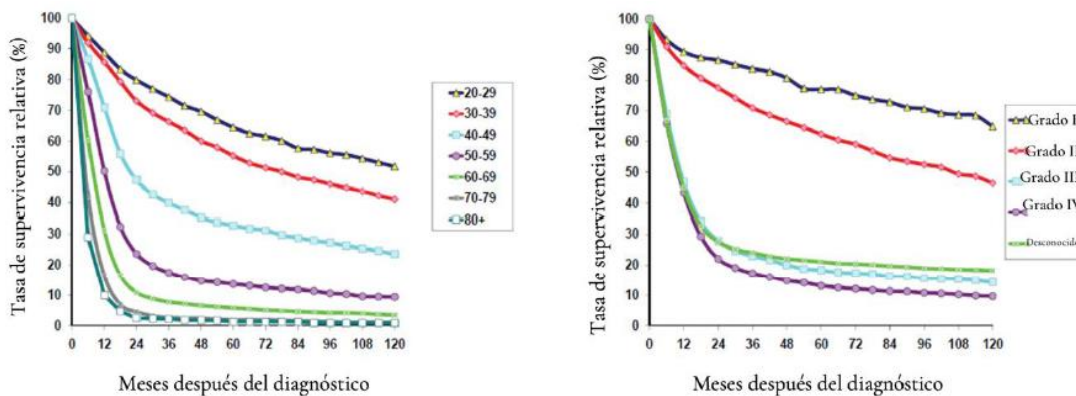


Figura 3. Supervivencia relativa por grupo de edades (izquierda). Supervivencia relativa por grado de tumor (derecha) Modificada de Ries et al, 2007.

A pesar de que la clasificación de la Organización Mundial de la Salud (OMS) sirve para predecir la esperanza de vida del paciente, varios investigadores se han dado a la tarea de generar una clasificación mucho más específica con ayuda de estudios genéticos. Con ellos se han identificado cambios en el genoma que pueden funcionar como posibles blancos terapéuticos, además de ayudar a comprender de mejor manera la carcinogénesis de este tipo de tumor. En estudios de secuenciación, específicamente para glioblastoma, se han encontrado presencia de mutaciones en genes “drivers” de gliomagénesis, incluidos mutaciones en los genes de isocitrato deshidrogenasa 1 (IDH1) y en la vía NF-κB, además, en genes supresores de tumores como el de retinoblastoma (RB), p16 y p53, además en el gen de neurofibromatosis tipo 1 (NF1), y en oncogenes de la familia de los Receptores de Tirosina Cinasas (RTK). (Chen et al., 2012).

## 15 Glioblastoma o Astrocitoma grado IV

Desarrollado en células gliales, es el tumor del SNC más común y letal.(Holland, 2000). Estos tumores presentan una alta invasividad, ya que pueden penetrar el parénquima cerebral, además de que exhiben una elevada vascularidad, debido a esto los tumores se vuelven extremadamente reincidentes. Aunado a lo anterior, incluso con las terapias actuales, sigue siendo una enfermedad con un pronóstico extremadamente bajo de sobrevivencia. Pacientes que presentan estas neoplasias, tienen una media de sobrevivencia de máximo 15 meses desde que han sido diagnosticados. (Hanif et al., 2017; Louis et al., 2016).

Además de la clasificación realizada por la OMS, estos tumores se pueden clasificar basándose en sus características clínicas (a pesar de que son indistinguibles a nivel morfológico), en glioblastomas primarios y secundarios. Los glioblastomas primarios surgen *de novo*, sin ningún tipo de evidencia histológica o clínica de alguna lesión precursora. A diferencia de los glioblastomas primarios, los secundarios progresan lentamente de astrocitomas preexistentes de menor grado (Hanif et al., 2017).

Se ha visto que 95% de los glioblastomas surgen *de novo*, y se presentan en personas adultas, mientras que los secundarios, son un poco más raros, y tienden a ocurrir en pacientes mayores a 45 años. Se sabe ahora que ambos subtipos constituyen distintas enfermedades, con diferencias genéticas específicas. (Agnihotri et al., 2013).

Los tumores primarios están caracterizados por la mutación y amplificación del gen del receptor del factor de crecimiento epidermal (EGFR), pérdida de heterocigosidad (LOH) del cromosoma 10q que contiene al homólogo de la fosfatasa y tensina (PTEN), sobreexpresión de la ubiquitina ligasa E3 (MDM2) y delección de *p16*. Las características de los tumores secundarios incluyen mutaciones del gen de la proteína supresora de tumores *TP53* y de retinoblastoma (RB), sobreexpresión del factor de crecimiento derivado de plaquetas A (PDGFA) y del receptor del factor de crecimiento derivados de plaquetas  $\alpha$  (PDGFR $\alpha$ ), al igual que LOH de 19q. Figura 4 Si bien, estas mutaciones son características de cada grupo, no están exentas de que aparezcan ambos grupos de mutaciones sobre un tipo de cáncer. (Agnihotri et al., 2013).

Además de esta clasificación, existe una más puntual a la de tumores primarios y secundarios, esta subclasificación, está hecha de acuerdo con una evaluación de los perfiles de transcripción de diversos glioblastomas, estos subtipos moleculares son: proneural, neural, clásico y mesenquimal. Figura 4 (Liu et al., 2018).

Cada subclasificación presenta sus propios perfiles de expresión, pero pueden compartir similitudes entre ellos. Las características principales del subtipo proneural son mutaciones puntuales en los genes, de la enzima isocitrato deshidrogenasa 1 (*IDH1*) y de *TP53*. El subtipo neural, se encuentra tipificado de acuerdo con la expresión de marcadores neuronales como el neurofilamento ligero (*NEFL*), la subunidad alfa-1 del receptor tipo A del ácido  $\gamma$ -aminobutírico (*GABRA1*), sinaptotagmina- 1 (*SYT1*) y el miembro 5 de la familia 12 de acarreadores de solutos (*SLC12A*). Por otro lado, el subtipo clásico, se basa en las altas tasas de expresión del EGFR, y variedad en la ausencia de mutaciones de la proteína TP53.

Finalmente, el mesenquimal presenta mutaciones en el gen *NF1*, casualmente acompañadas por mutaciones en *PTEN* y *TP53*. (Liu et al., 2018) Figura 4 y Tabla 2.

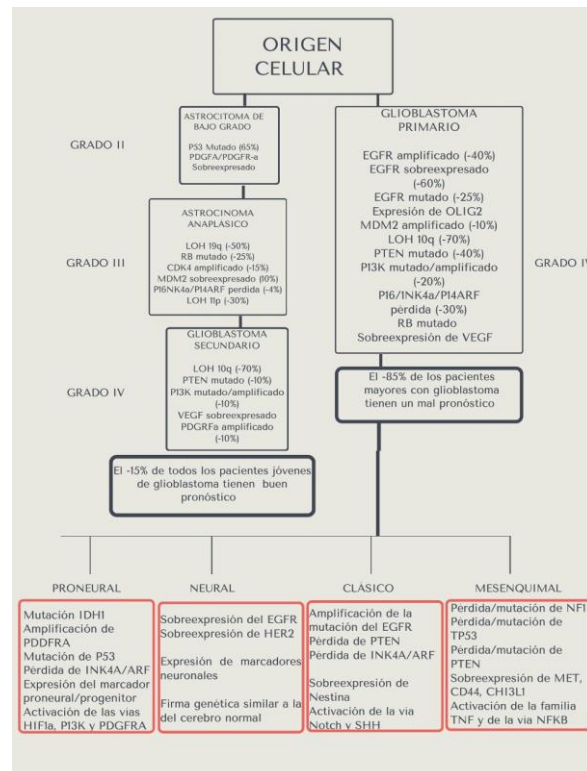


Figura 4. Patogénesis genética y molecular del GBM. Se muestran las alteraciones genéticas y cromosomales envueltas en glioblastomas primarios y secundarios. Modificada de Agnihottri et al., 2013

La importancia de tener varias clasificaciones y subclasificaciones de los glioblastomas radica en poder generar un mejor diagnóstico el cual llevará a un mejor enfoque terapéutico debido a la elevada variedad de características entre tumores. Esto también sugiere que existan diferentes etiologías o diferentes orígenes celulares (Agnihotri et al., 2013; Verhaak et al., 2010).

Tabla 2. Frecuencia de genes mutados en glioblastomas (modificada de Liu et al., 2018)

| Gen      | Proneural<br>(n = 37) | Neural<br>(n = 19) | Clásica<br>(n = 22) | Mesenquimal<br>(n = 38) |
|----------|-----------------------|--------------------|---------------------|-------------------------|
| TP53     | 20 (54%) *            | 4 (21%)            | 0 (0%)              | 12 (32%)                |
| PTEN     | 6 (16%)               | 4 (21%)            | 5 (23%)             | 12 (32%)                |
| NF1      | 2 (5%)                | 3 (16%)            | 1 (5%)              | 14 (37%) *              |
| EGFR     | 6 (16%)               | 5 (26%)            | 7 (32%)             | 2 (5%)                  |
| IDH1     | 11 (30%) **           | 1 (5%)             | 0 (0%)              | 0 (0%)                  |
| EGFRvIII | 1 (3%)                | 0 (0%)             | 5 (23%)             | 1 (3%)                  |
| PDGFRA   | 4 (11%)               | 0 (0%)             | 0 (0%)              | 0 (0%)                  |

Una de las causas principales de esta gran heterogeneidad intratumoral y resistencia a las quimioterapias de los glioblastomas, se debe y/o se promueve por las células troncales de glioblastoma (GSC). Estas células, tienen características que presentan las células troncales, la diferenciación y la autorrenovación. Dichos rasgos son de gran relevancia pues aumentan las capacidades de resiliencia de las células de glioblastoma. (Bradshaw et al., 2016; Singh et al., 2003)

Estas propiedades, se ven reflejadas en las variaciones subclonales, características de nicho como lo son la hipoxia, la vascularización, inflamación, etc., y la capacidad de repoblación de las GSCs. Estas características, generan alta variabilidad y propician la formación de nichos por todo el tumor, los cuales son inestables e independientes generando así adaptabilidad en su entorno. (Prager et al., 2020)

A pesar de que se sabe cuáles son los criterios fundamentales de las GSCs, hace falta conocer más acerca de sus características moleculares. Sin embargo, se sabe que influyen de manera importante en el desarrollo del glioblastoma debido a que son genética y transcripcionalmente heterogéneas, haciendo más difícil la terapia con los tratamientos actuales generando recurrencia tumoral. Por lo cual el conocimiento del origen celular del glioblastoma es fundamental para el entendimiento de la enfermedad, y así, direccionar mejores tratamientos. (Bayin, 2014) (Kim et al., 2021)

## 16 Origen celular del glioblastoma

Se cree que existen tres tipos del origen celular del glioblastoma. A partir de células troncales neurales (NSC), de astrocitos derivados de NSC y de células precursoras de oligodendrocitos (OPCs). Esta teoría se basa en 3 tipos de observaciones: 1) En la expresión de marcadores de superficie y en la morfología de las células de glioblastoma, que son similares a aquellos tipos de células normales en el SNC, 2) La similitud de los perfiles genéticos entre las células de glioblastoma y las células normales y 3) En modelos genéticos de glioblastoma en ratones, se ha mostrado que muchos tipos de células en el SNC como las NSC, astrocitos derivados de NSC y OPCs son capaces de desarrollarse hacia glioblastomas. (Yao et al., 2018).

El origen celular es el mayor determinante del subtipo molecular y posiblemente contribuya al desarrollo tumoral pues se ha demostrado que los tumores derivados de diferentes orígenes celulares exhiben diferentes comportamientos en modelos de glioblastoma en ratones. (Yao et al., 2018). Esto sugiere que el origen celular puede contribuir significativamente al desarrollo del glioblastoma. (Ghazi et al., 2013).

A pesar de los diferentes orígenes celulares, estos tumores comparten una característica en común la cual es la reprogramación de su metabolismo. Con esto se favorece la proliferación, supervivencia e invasión ya que generan numerosas adaptaciones metabólicas.

Esta característica ha sugerido que la estrategia terapéutica contra el metabolismo anormal sea más conveniente que la terapia génica debido a la gran cantidad de genotipos en los glioblastoma. Además, dichos cambios en el metabolismo de estas células tumorales podrían utilizarse como biomarcadores para asegurar una terapia más efectiva. (Zhou & Wahl, 2019).



## 17 Metabolismo desregulado de glioblastomas

El metabolismo desregulado es un sello distintivo en las células cancerosas, pues se sabe que estas células restablecen su metabolismo para fomentar la proliferación incontrolada, ya que es así como llegan a abastecer todas sus necesidades nutrimentales. (Hanahan & Weinberg, 2011). Dentro de estos nutrientes claves, podemos encontrar al lactato, la glucosa y la glutamina. Este último metabolito está involucrado en varios procesos biosintéticos tales como la generación de ATP, síntesis de nucleótidos, de proteínas y de lípidos, (Figura). La glutamina es el precursor metabólico del glutamato, el cual juega un papel fundamental en el funcionamiento normal del cerebro. Los tumores cerebrales que se desarrollan dentro de este microambiente rico en glutamina y glutamato pueden establecer conexiones sinápticas con neuronas glutaminérgicas y reprogramar el metabolismo de la glutamina para favorecer el crecimiento de las células tumorales. (Natarajan & Veneti, 2019).

Varios estudios demuestran que la glutamina es un importante nutriente involucrado en múltiples aspectos del metabolismo canceroso y no es de extrañarse, pues la glutamina es el aminoácido más abundante en la sangre y el músculo, utilizándola en gran medida para generar energía y como precursor de biomasa para la rápida tasa de proliferación que presentan las células cancerosas. Por estas razones, las células cancerosas, en su gran mayoría dependen de este aminoácido para su supervivencia. (Choi & Park, 2018).

El proceso para poder ingresar la glutamina a las células está mediado por varios transportadores, de solutos, SLC por sus siglas en inglés, divididos en 4 familias, SLC1, SLC6, SLC7 y SLC38. Muchas células cancerosas, incluidas las cerebrales como el glioblastoma, tienen una alta dependencia a la glutamina ya que la gran mayoría tiene sobre expresado el transportador de glutamina SLC1A5, también llamado Transportador 2 de Cisteína, Serina y Alanina, ASCT2. (Choi & Park, 2018) (Scalise et al., 2020) Una vez que la glutamina ingresa a las células por algunos de estos transportadores, es catabolizada por la glutaminasa, GSL1 o GSL2, generando glutamato. En las células cancerosas, este aumento en el ingreso, transporte y metabolismo de la glutamina a través de GSL1 o GSL2, conlleva a la generación de recursos metabólicos necesarios para la supervivencia tumoral. (Quinones & Le, 2018; Yang et al., 2017).

Al igual que la glutamina, el glutamato además de ser un neurotransmisor en células del SNC, es un sustrato bioenergético importante para el crecimiento óptimo de las células cancerosas. Se ha encontrado también que modula el desarrollo, la proliferación y la metástasis mediante la regulación de vías de señalización. (Yi et al., 2020). El glutamato también está inmerso en distintas vías

metabólicas, como lo son la síntesis de aminoácidos, de ácidos nucleicos y sirve como precursor dentro del ciclo del ácido cítrico y la síntesis del glutatión. (Ann L Coker, 2017).

Se ha observado que diversas células cancerosa del SNC presentan niveles elevados en la expresión de transportadores de glutamato. Además, estudios *in vivo* muestran un notable aumento en los niveles séricos de glutamato en pacientes con cáncer de próstata, páncreas y mama. (Quinones & Le, 2018; Yi et al., 2020).

La dependencia a estos sustratos por parte de las células cancerosas los ha convertido en posibles blancos terapéuticos contra el cáncer, aunque con la desventaja de no tener una selectividad definida hacia las células cancerosas. Ejemplo de ello son la acivicina y la azaserina que privan de glutamina tanto a las células tumorales como a las células no tumorales, lo que las hace más tóxicas que terapéuticas. A partir de esos y más hallazgos, se ha generado un nuevo interés en desarrollar nuevos enfoques terapéuticos asociados a la glutamina y el glutamato, aunque no directamente a tumores del SNC, como los compuestos CB8389 y el bis- 2- (5-fenilacetamido-1,2,4-tiadiazol-2-il) etil sulfuro, que han mostrado buena eficacia en ensayos preclínicos con líneas celulares cancerígenas de cáncer de colon y de leucemia. (Altman et al., 2017; Yi et al., 2020).

Otro tipo de precursor energético que ha sido estudiado ampliamente, pero se desconoce con exactitud el papel que tiene en el desarrollo del cáncer es el lactato. Desde 1923, Otto Warburg ya había registrado este tipo de alteraciones metabólicas. Observó que las células cancerosas se caracterizaban por una glucólisis acelerada y formación un exceso de lactato aun cuando el oxígeno estaba presente. Dentro de sus experimentos también encontró que la producción y acumulación de lactato en células tumorales era 70 veces mayor que en células sanas. Comprobó que el lactato en sangre era superior en vasos sanguíneos que abandonan los tejidos tumorales que la concentración de lactato en los vasos sanguíneos que entran a los tumores. (Hanahan & Weinberg, 2011; Warburg, 1924).

Sumado a lo anterior, el cerebro es un órgano altamente metabólico, el cual consume cerca del 20% de la energía derivada de la glucosa, por lo cual no es de sorprender que los tumores derivados de este tejido, en especial el glioblastoma, tengan alteraciones sobre esta vía. (Mergenthaler et al., 2014).

La naturaleza altamente glucolítica de los glioblastoma muestra la propensión que tienen estos tumores en metabolizar la glucosa a lactato de manera exacerbada. Los glioblastomas generan lactato aun cuando el oxígeno se encuentra presente (efecto Warburg) con la finalidad de utilizar los carbonos derivados de la glucosa para síntesis de componentes celulares, mientras se sigue manteniendo una suficiente cantidad de ATP para reacciones celulares. (Mischel, 2019). Una vez generado el lactato, los glioblastomas expulsan ácido láctico al microambiente tumoral, con lo que se acidifica el medio

y propicia un ambiente favorable para el desarrollo tumoral y que esto a su vez, mejore el flujo glucolítico, a través de transportadores transmembranales denominados transportadores de monocarboxilato (MCT). De estos tipos de transportadores existen solo 4 que desempeñan un papel importante en el transporte del ácido láctico en tejidos de mamíferos, incluidos los tumores. En consecuencia, el transporte del lactato por los MCT representa una vulnerabilidad de las células cancerosas que puede ser explotado terapéuticamente. (Colen et al., 2011).

Otra pieza clave dentro del metabolismo del lactato, que además es un blanco terapéutico, es la enzima lactato deshidrogenasa (LDHA y LDHB), pues media la conversión bidireccional del piruvato y lactato. La diferencia de expresión entre estas isoenzimas dependerá del tipo de células cancerosas en el tumor. (Doherty et al., 2013).

Se han realizado experimentos donde se eliminan selectivamente a algunas de estas isoformas con resultados muy prometedores, además, existen inhibidores de LDHA, llamados galoflavina, gosipol o AT-10 y un derivado de gosipol el FX11, en donde se observan grandes avances terapéuticos llegando a ensayos clínicos de fase I y II. En conjunto, estas moléculas son punto de partida prometedores para una inhibición de la LDH, pues claro está, que existe la necesidad de desarrollar compuestos que sean más potentes y selectivos. (Doherty et al., 2013).

Estas características, junto con algunas otras inmersas en el metabolismo desregulado del cáncer, específicamente en el glioblastoma, permiten proponer el desarrollo de nuevos fármacos que inhiban enzimas clave dentro de este Hallmark y ser utilizadas como un potencial blanco terapéutico.

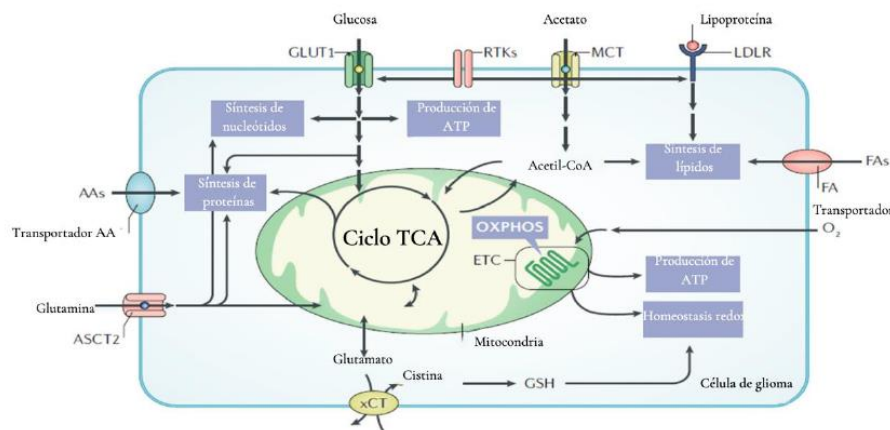


Figura 5. Metabolismo desregulado tumoral; utilización e ingesta de nutrientes en células de glioma Modificada de Mischel, 2019.

## 18 Especies Reactivas de Oxígeno (ROS) en glioblastoma

En células de glioblastoma, como en cualquier otra célula cancerosa, durante la reprogramación metabólica se genera un aumento en la producción intrínseca de especies reactivas de oxígeno (ROS). Estas ROS, consisten en sustancias reactivas que derivan de una reducción parcial de oxígeno, compuesto de electrones desacoplados ubicados en la última capa de valencia del oxígeno. Las ROS pueden surgir tanto de vías intrínsecas como extrínsecas. La vía endógena produce ROS por diferentes fuentes como la mitocondria, peroxisomas, metabolismo y activación de células inflamatorias. En la vía exógena, intervienen agentes ambientales, radiación, fármacos, y químicos industriales. (Klaunig & Wang, 2018; Rinaldi et al., 2016).

En el metabolismo de las células tanto no tumorales como en las tumorales, aunque con una gran diferencia en los niveles de producción, las especies reactivas de oxígeno más agresivas que se generan son los radicales hidroxilos ( $\cdot\text{OH}$ ). Su formación celular, puede ser mediada por metales de transición en su forma de ion, como el  $\text{Fe}^{2+}$  y  $\text{Cu}^+$  y estos metales pueden mediar la producción de  $\cdot\text{OH}$ , en las reacciones Haber-Weiss y Fenton. La otra especie de radical libre comúnmente encontrada es el anión superóxido ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) que puede ser reducida de al menos dos maneras, ya sea espontáneamente con ayuda de la Superóxido Dismutasa, SOD, o a través de la reacción Haber-Weiss. Esta reducción generará oxígeno y peróxido de hidrógeno, y este último puede ser oxidado por la enzima peroxidasa y la enzima catalasa. Este  $\text{H}_2\text{O}_2$  puede reaccionar con metales de transición en su estado reducido (reacción Fenton) para formar  $\cdot\text{OH}$  y  $\text{OH}^-$  y así seguir generando más daño al material genético, proteínas, etc. (Perillo et al., 2020; Shimokawa & Satoh, 2017; Tudek et al., 2010).

Si bien los niveles de ROS en las células sanas son bajos, estas especies pueden jugar papeles importantes dentro de algunos procesos celulares cruciales como la diferenciación, la migración, la progresión o la proliferación. En específico la molécula de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , que debido a que sus propiedades químicas como tiempo de vida media relativamente corto, detoxificación rápida e interacción con tioles, la hacen una molécula que puede actuar como segundo mensajero. (Shimokawa & Satoh, 2017).

En las células tumorales la producción excesiva de ROS promueve un potencial carcinogénico inducido por estrés oxidativo el cual tendrá como consecuencia genotoxicidad e interferirá en procesos celulares cruciales. El resultado de dicha sobreproducción es capaz de modificar la estructura de las proteínas de señalización a través de un proceso directo de fosforilación y activación de numerosas proteínas incluidas las Proteína Cinasas B y C, PKB y PKC, la Fosfolipasa C, PLC  $\gamma$ 1, RTKs, PKC, PLC $\gamma$ 1, Cinasas Src, MAPKs, entre otras. Un ejemplo de activación de RTKs, se da

cuando el  $H_2O_2$ , induce la fosforilación del receptor de PDGF y de EGF, sugiriendo que estos radicales, inician cascadas de señalización que imitan aquellos inducidos por factores de crecimiento. (Boonstra & Post, 2004; Shimokawa & Satoh, 2017; Tudek et al., 2010).

Se sabe que las ROS, pueden atacar componentes celulares, causando un daño oxidativo y fragmentación de ácidos nucleicos, proteínas y lípidos. (Rinaldi et al., 2016) Sin embargo, existen muchos factores que le permiten a la célula responder al daño inducido por ROS, dependiendo de la duración y de la intensidad del estímulo, y en específico, del contexto de la señal. (Klaunig & Wang, 2018).

Para ello, la célula tiene diversos mecanismos que ayudan en la desintoxicación de ROS, dentro de los cuales podemos encontrar a moléculas no enzimáticas como el glutatión, los flavonoides y las vitaminas A, C y E, o a través de enzimas antioxidantes. De estas últimas están la SOD, que convierte el anión superóxido a peróxido de hidrógeno y oxígeno: la catalasa, la cual facilita la conversión de peróxido de hidrógeno a agua y oxígeno, las peroxiredoxinas y tioredoxinas peroxidases que catalizan la reducción de peróxido de hidrógeno, y peroxinitritos. La combinación de ambos sistemas ayuda a que las ROS no ejerzan efectos sobre componentes claves en la célula. Al parecer en el glioblastoma, estos mecanismos de protección se encuentran dañados. (Toosi, 2014).

La comprensión del mecanismo por el que especies reactivas de oxígeno afectan a las células tumorales tanto internamente como en el entorno tumoral, es de vital importancia para poder generar mejores terapias oncológicas, pues se puede aprovechar la cualidad de las células tumorales al tener un nivel basal de ROS superior al de las células normales; por ejemplo, la terapia oxidante, que consiste en administrar y entregar ROS citotóxicos al tumor sólido o inactivando el sistema enzimático antioxidante. (Rinaldi et al., 2016).

## **19 Migración, proliferación y evasión de la muerte celular de glioblastomas**

Las alteraciones genéticas y moleculares presentes en el glioblastoma, en parte consecuencia de la acumulación de ROS, la reprogramación metabólica, y otros factores; llevan a la modificación de muchas vías de señalización generando un crecimiento descontrolado y la progresión tumoral. (Feitelson et al., 2015).

Algunas de las cascadas de señalización que se encuentran alteradas son la vía de PI3K/AKT, Rb, p53-ARF-MDM2 y la vía de receptores de cinasas de tirosina, que contribuyen al desarrollo y progresión del glioblastoma. (Zhang et al., 2018).

La vía p53-ARF-MDM2 está desregulada en la mayoría de los pacientes que presentan glioblastoma, alrededor de un 85%. El supresor de tumores y factor de transcripción p53, tiene un papel importante en varios procesos celulares como la apoptosis, el mantenimiento de la estabilidad genética, la progresión tumoral, la invasión, la migración, regulación del metabolismo, entre otros. Mutaciones tanto en p53, como en las proteínas que regulan esta vía, ARF y MDM2, son características comunes en tumores de glioblastoma que presentan alto grado de malignidad. (Zhang et al., 2018).

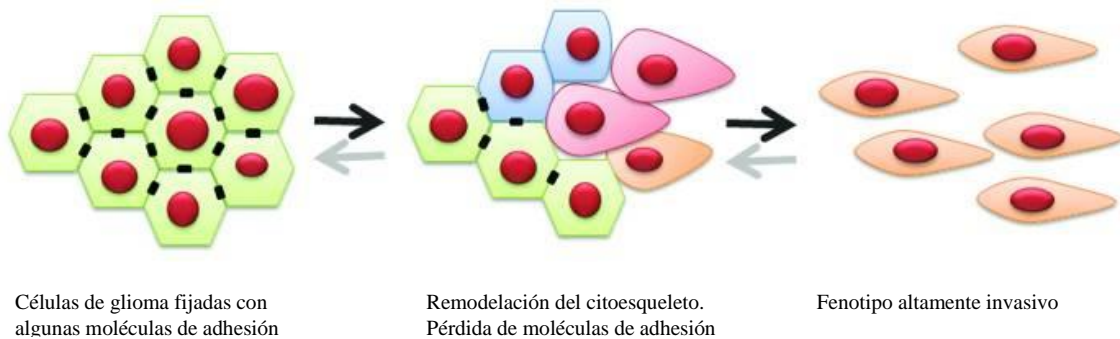
La vía PI3K/AKT/mTOR junto con un tipo de RTK, el receptor del factor de crecimiento epidermal (EGFR), también desempeñan un papel muy importante en procesos tumorales en el glioblastoma pues se sabe que controlan la división celular, la migración, la adhesión, el metabolismo, la apoptosis, etc., En este tipo de tumores, esta vía también se encuentra alterada debido a mutaciones en EGFR y PTEN principalmente, provocando la activación constante de PI3K/Akt/mTOR y por ende los procesos mencionados anteriormente se mantendrán activos, aumentando la malignidad de la célula tumoral. (X. Li et al., 2016).

Otras alteraciones encontradas en este tipo de tumores son aquellas en la enzima isocitrato deshidrogenasa-1 (IDH1), desregulación de las proteínas de la vía Wnt/ $\beta$ -catenina, desregulación de las proteínas de la vía de las MAPK, o mutaciones en la enzima clave para la resistencia a temozolomida la MGMT.

Uno de los procesos señalado anteriormente que se ve afectado en las células tumorales es la capacidad migratoria. En términos fisiológicos, es el mecanismo por el cual las células cancerígenas migran a sitios distintos del que se originaron (metástasis) a través de rutas hematógenas o linfáticas. Una vez logrado lo anterior, estas células tumorales tienden a invadir el tejido local al cual llegaron, esto con la finalidad de generar un nuevo tumor. (Liu et al., 2018).

La invasividad del glioblastoma es un proceso complejo ya que muchas vías de señalización se ven involucradas. Este mecanismo toma lugar tanto en células embrionarias durante el desarrollo como en células cancerosas durante la formación de metástasis, también llamada transición epitelio-mesénquima (EMT). En los glioblastomas se llevan a cabo cambios moleculares incluidos el remodelamiento de la matriz extracelular (ECM), reordenamiento del citoesqueleto y adquisición de características similares a las de las células troncales (Liu et al., 2018).

La EMT tiene estrecha relación con la invasión del glioblastoma debido al microambiente que genera el tumor. Esta EMT tiene un papel importante en el microambiente, ya que sirve como plataforma



*Figura 6. Transición epitelio mesénquima en células de glioma. Modificada de Iwadate, 2016*

pasiva en el crecimiento y migración de los glioblastomas. Figura (Iwadate, 2016; Taylor et al., 2015) Las células cancerosas utilizan esta habilidad migratoria intrínseca para invadir tejidos adyacentes y vasculares para generar metástasis, por lo que encontrar blancos terapéuticos para las vías que se ven afectadas es sumamente importante.

Otra particularidad importante que se ve alterada en el glioblastoma es su capacidad de proliferación sostenida, la cual está estrechamente relacionada con la migración pues comparten vías de señalización. Un ejemplo de esto se ha encontrado en gliomas de alto grado de malignidad, en un proceso conocido como “Go-or-Grow”. En él, las células altamente proliferativas se encuentran rodeadas de células altamente invasivas, las cuales tienen altos grados de motilidad, por lo que dichas células pueden migrar o proliferar dependiendo de sus necesidades, favoreciendo así la tumorigénesis.(Mehta & Lo Cascio, 2018).

La proliferación y la supervivencia de cualquier tipo celular es debido al control parcial de factores de crecimiento y a las hormonas. Las alteraciones que existen en las vías de señalización por parte de las células tumorales, como resultado de un conjunto de mutaciones y/o modificaciones epigenéticas, hacen que las células tengan alta tasa proliferativa y que sean independientes a estas vías. (Feitelson et al., 2016; Jaouen et al., 2015).

Para promover este fenómeno proliferativo en células tumorales, las señales proliferativas están exacerbadas y las señales anti-proliferativas están disminuidas. Algunos ejemplos de vías que se encuentran desreguladas son: la vía Wnt/ $\beta$ -catenina, PI3K/Akt/mTOR, Ras, Notch, entre otras. (Feitelson et al., 2016; Jung & Park, 2020a).

Además, la proliferación cuenta genéticamente con varias deleciones, amplificaciones y mutaciones puntuales. Estas alteraciones activan cascadas de señalización río abajo de los receptores de cinasas de tirosina, como el EGFR y el PDGFR, entre otros. (Holland, 2000).

Otra alteración muy importante que tiene estrecha relación entre las vías de señalización mencionadas anteriormente es p53, que evade la muerte celular, en específico la apoptosis. La apoptosis es un mecanismo esencial por el cual se mantiene un balance entre proliferación y muerte celular. En la apoptosis, las células activan una vía molecular que lleva a las células a morir en caso de que se encuentren dañadas y los mecanismos de reparación fallen. Este proceso se logra activar por medio de 2 vías moleculares, la vía intrínseca y la vía extrínseca.(J. Li & Yuan, 2008).

La vía intrínseca, envuelve una gama diversa de estímulos no mediados por receptores que producen señales intracelulares que actúan directamente sobre diversos blancos, dentro de la célula y son eventos que surgen por daños mitocondriales. Estos estímulos, van a provocar la permeabilización (regulada por proteínas de la familia Bcl-2 principalmente) de la membrana externa mitocondrial, una pérdida del potencial de membrana y la liberación de proteínas pro-apoptóticas del espacio intermembranal hacia el citosol, tales como Smac/DIABLO, Omi/HtrA2, AIF endonucleasa G y el citocromo C. En el citosol, estas proteínas promueven la muerte celular al activar a las caspasas o por efectores de muerte independientes a las caspasas. (Fulda & Debatin, 2006).

Cabe señalar que, las proteínas que mayor importancia tienen sobre la vía intrínseca son las caspasas y las proteínas de la familia Bcl-2. En esta familia se encuentran proteínas tanto pro-apoptóticas (BIM, PUMA, BAX y BAK) como anti-apoptóticas (Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-W, entre otras) (Carrington et al., 2017; J. Li & Yuan, 2008).

En la vía extrínseca, la muerte celular es debido a las interacciones mediadas por receptores transmembranales, como son aquellos receptores de la familia del factor de necrosis tumoral TNF junto con sus ligandos por ejemplo FasL/FasR, TNF- $\alpha$ /TNFR1, Apo3L/DR3, Apo2L/DR4 y Apo2L/DR5.(Elmore, 2007; Fulda & Debatin, 2006).

En el glioblastoma, las células muestran una actividad deficiente o nula en la muerte celular vía apoptosis ya que diversas enzimas o reguladores de las vías señaladas presentan alteraciones. (Valdés-Rives et al., 2017).

Por tanto, algunas de las enzimas y/o reguladores de la apoptosis alterados en el glioblastoma son posibles blancos terapéuticos.



## 20 Epidemiología del glioblastoma

Los tumores del SNC, según datos reportados por el GLOBOCAN, son la décimo sexta causa de casos nuevos de cáncer, y la décimo segunda causa de muerte a nivel mundial. Estos mismos datos señalan que, el número tanto de incidencia como de mortalidad de tumores de SNC es de, 3.5 y 2.8 respectivamente, esto con relación a 100, 000 habitantes, Figura

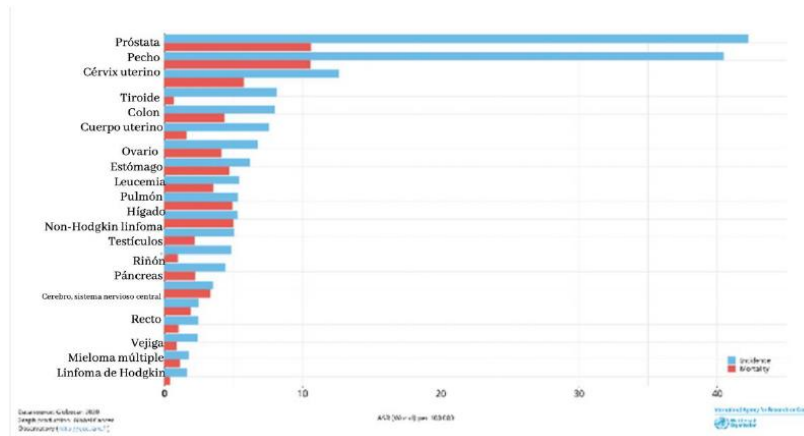


Figura 7. Rangos de incidencia y mortalidad de cáncer a nivel mundial en 2018 para ambos sexos y edades. En azul se muestra la incidencia y en rojo la mortalidad.

Cifras de Instituto Nacional de Cáncer en Estados Unidos (NCI, por sus siglas en inglés) junto con la Sociedad de Cáncer Americana (AI), muestran que el riesgo de ser diagnosticado con un tumor del SNC, maligno o no maligno, aumenta con la edad y dependerá del género del paciente.

En Estados Unidos, el glioblastoma representa cerca del 49% de tumores malignos y se presenta mayormente en hombres que en mujeres. Caso contrario para el tumor no maligno con mayor proporción, el meningioma, que representa cerca del 54% de los tumores no malignos y afecta principalmente a mujeres. Figura (Miller et al., 2021).

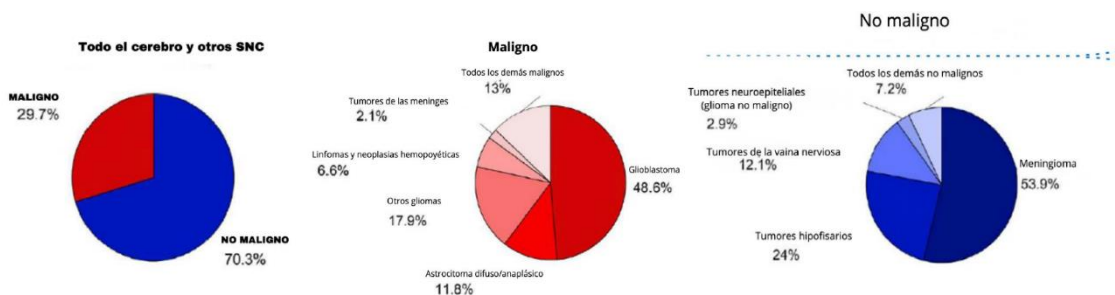


Figura 8. A) Porcentaje de Tumores del SNC, malignos y no malignos. B) Distribución porcentual de tumores malignos. C) Distribución porcentual de tumores no malignos. Modificada de Miller et al, 2021.

Las cifras de incidencia, en Estados Unidos, muestran que pasados los 75 años se encuentra el mayor riesgo de padecer glioblastoma, además el grupo de personas que se encuentra más predispuesto a padecer esta enfermedad son los adultos blancos no hispánicos, seguidos por los nativos americanos y los adultos hispánicos de descendencia afroamericana. (Miller et al., 2021).

Con respecto a la supervivencia, está dependerá del tipo de tumor del SNC, a menor grado de malignidad la esperanza de vida es mayor y viceversa. Tomando en cuenta solo al glioblastoma, esta enfermedad es la que menor porcentaje de sobrevivencia presenta, pues es cercana al 1.2% tomando en cuenta un rango de 5 años. De igual manera esto dependerá principalmente de la edad del paciente y de su género. Figura\_ (Hermann et al., 2009; Miller et al., 2021).

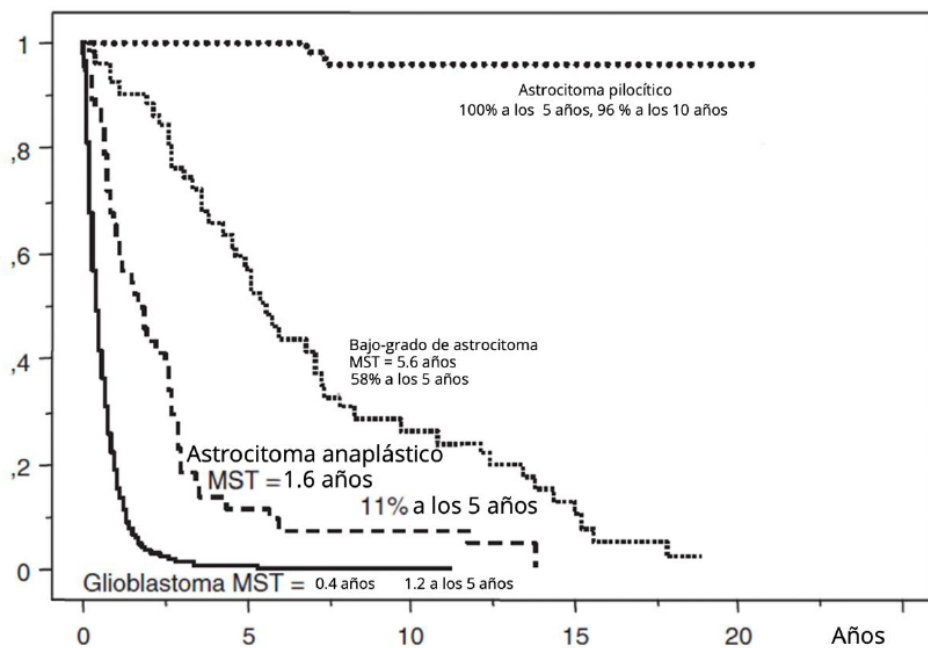


Figura 9. Supervivencia de pacientes con tumores astrocíticos. Cum, acumulativo; MST, Tiempo de Supervivencia Media. Modificada de Hermann, Dietrich, & Volker, 2009

Acerca de los factores de riesgo asociados a los tumores de SNC, al menos a nivel mundial, solo se sabe que existe un factor inequívoco asociado a tumores del SNC, la exposición a radiación ionizante como lo son los rayos X. Estos son usados en niños que reciben este tipo de irradiación para tratar la Leucemia Linfoblástica Aguda (ALL) y se ha visto que los tumores del SNC se desarrollan después de 7-9 años. (Hermann et al., 2009).

En México, la epidemiología de tumores del SNC es incierta, debido a que la mayoría de los estudios incluyen un limitado número de casos de tumores específicos. Esta falta de información genera dificultad para proveer inferencias acerca de la etiología, los factores de riesgo asociados y la

magnitud del problema de salud que esta enfermedad causa. Afortunadamente, en el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía de México (INNN), en el 2020, el grupo de Aguirre-Cruz, presentó un estudio observacional, descriptivo y retrospectivo donde analizaron tumores del SNC que han sido registrados en esa institución a lo largo de 5 décadas, describiéndose la distribución, frecuencia y grado de malignidad de los tipos de tumores del SNC, con relación a la edad y género de los pacientes atendidos desde 1965 hasta 2014.

Según este estudio, los tumores astrocíticos del SNC más comunes en México, dentro del grupo de tumores neuroepiteliales y sin importar la edad, fueron los astrocitomas grado IV o también conocidos como glioblastomas. (Aguirre-Cruz et al., 2020).

Tomando en cuenta datos ofrecidos por el GLOBOCAN, la incidencia y mortalidad que corresponde a los tumores del SNC en México, son en números de incidencia y mortalidad de 2.7 y 2.0, respectivamente, por cada 100, 000 habitantes, Figura.

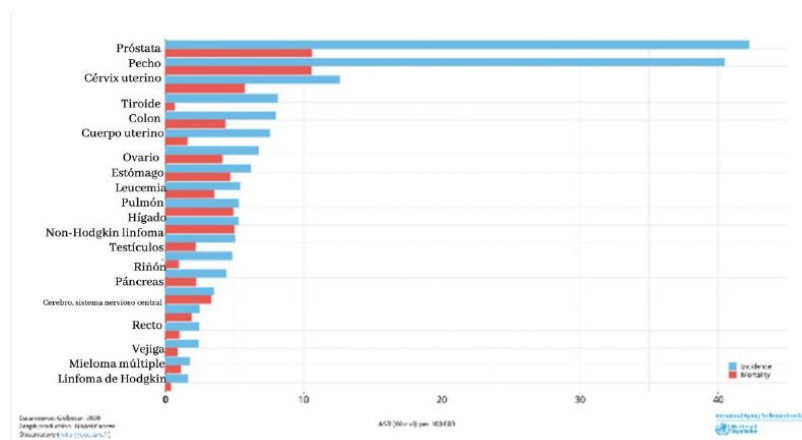


Figura 10. Rangos de incidencia y mortalidad de cáncer en México en el 2018, para ambos sexos y edades. En azul se muestra la incidencia y en rojo la mortalidad. GLOBOCAN, 2018.

Si bien los tumores del SNC en México, son raros en la población, estos representan una carga desproporcionada en la mortalidad, es decir, en la gran mayoría de los casos que se presentan el paciente fallece, (Figura). Por tal motivo es indispensable encontrar nuevos agentes terapéuticos que estén dirigidos hacia estos tipos de tumores, pero en específico para el glioblastoma. Entre las nuevas opciones se encuentra la generación de nuevos fármacos quimioterapéuticos con organometales en su estructura, estos metales van más allá del platino, generalmente utilizado para generar *cis*-platino y derivados, utilizando elementos como el rutenio, hierro, renio, entre otros.

## 21 Terapias actuales para glioblastomas

A pesar de la continua búsqueda, el tratamiento para este tipo de tumor sigue siendo un desafío en la oncología clínica, ya que durante la última década varios tratamientos fueron aplicados con muy poco éxito. (Hanif et al., 2017).

Los tratamientos actuales pueden dividirse en definitivos y sintomáticos. Los primeros hacen referencia al tratamiento hacia el tumor directamente e incluyen radioterapia, quimioterapia y cirugía. Los sintomáticos, por otro lado, están dirigidos a reducir los efectos del tumor en el cerebro e incluyen estrategias como administración de esteroides (dexametasona) para reducir la hinchazón y el edema. (Sontheimer & Sontheimer, 2015).

Debido a la invasividad del glioblastoma, en cirugía raramente se eliminan todas las células tumorales, por lo que un tratamiento post quirúrgico es necesario. (Shergalis et al., 2018). El tratamiento estándar, para pacientes con este tipo de tumor, es una dosis de temozolomida a razón de  $75\text{mg}/\text{m}^2$ , seguido de una aplicación concomitante de radiación, usualmente la dosis se fracciona hasta alcanzar 60 Gys de tratamiento, comúnmente por sesión se dosifican 2 Gys. (Gorlia et al., 2012; Hanif et al., 2017).

A pesar de que la temozolomida se empezó a usar a finales del siglo pasado, no ha habido un compuesto que sea específico para glioblastomas. Algunos de los tratamientos actuales, para potenciar los efectos quimioterapéuticos, utilizan un cóctel de procarbazona, lomustina (CCNU), y vincristina, comúnmente conocido como PCV. (Hanif et al., 2017).

Debido al grado en que se encuentran los glioblastomas, los tratamientos actuales, solo hacen posible que, tras un diagnóstico de este tipo tumoral, los pacientes alcancen una media de supervivencia de no más de 15 meses. (D'Alessio et al., 2019).

Por ello es indispensable seguir investigando terapias nuevas para poder ofrecer a los pacientes con este tipo de tumores una alternativa. Actualmente moléculas organometálicas, como la ferrocenilselenoamida, se proponen como posibles agentes antitumorales por las características citotóxicas que presentan.

## 22 Organometales: Metalocenos y compuestos sándwich

Los complejos de metales de transición poseen propiedades atractivas, que los hacen alternativas prometedoras como agentes orgánicos antitumorales. Una de las propiedades de estos compuestos es su capacidad de adoptar varias geometrías basadas en el número de enlaces de coordinación que poseen, lo cual significa que incrementan la diversidad estructural. Por ejemplo, un enlace octaédrico de estos complejos, con 6 diferentes ligandos, puede formar alrededor de 30 estereoisómeros. Además, ligandos auxiliares pueden inducir significativamente efectos *trans* en el enlace metal-carbón que pueden cambiar la reactividad de otros ligandos en el complejo (Liang et al., 2017).

Los metalocenos, en sentido amplio, tienen una estructura  $M\text{Cp}_2$  (bis-cyclopentadienyl) que son conocidas para todos los metales de transición. Estos compuestos tienen aplicaciones en síntesis orgánica, catálisis, polímeros y en química medicinal. La estructura tipo sándwich, está reservada para la primera fila de los metales de transición de titanio a níquel, para la columna de hierro y también para otro tipo de metales incluido el selenio y rutenio (Acevedo-Morantes et al., 2012; Gasser et al., 2011; Ram & Jesu, 2012).

## 23 Compuestos organometálicos de rutenio

El desarrollo de compuestos metálicos con actividad anticancerígena, inicialmente se enfocaba solamente al platino, *e.g.* cisplatino, carboplatino, etc. Actualmente se ha extendido hacia otros metales de transición, dentro de los cuales se encuentra el rutenio que parece ser unos de los candidatos más atractivos (Novohradský et al., 2014).

En comparación con fármacos que tienen en su estructura platino, los fármacos con rutenio, en general, son menos tóxicos y son activos en tumores que no responden de manera adecuada a los fármacos con platino (Hartinger & Dyson, 2009).

La idea de utilizar compuestos organometálicos que tuvieran en su estructura rutenio como anticancerígeno fue desarrollada por Tocher et al. quien proponía que la coordinación del centro metálico con el ADN causa modificaciones estructurales, lo que lleva a la inducción de la apoptosis (Gasser et al., 2011).

Aunque recientemente se ha encontrado que los complejos con rutenio son altamente inespecíficos por sus blancos, la interacción con diversos ligandos podría afectar a distintos procesos celulares,

dependiendo del tipo de complejo de coordinación. (Ajay K. & Lallan, 2018.) Sin embargo, el mecanismo por el cual estas metalodrogas ejercen su efecto aún no está completamente entendido.

Solamente dos compuestos de rutenio, llamados, imidazolium trans-imidazoledimethylsulphoxide-tetrachlororuthenate (NAMI-A) e imidazolium trans-[tetra-chlorobis(1H-indazole)-ruthenate(III)] (KP-1019), han avanzado a estudios clínicos. También, un análogo del KP-1019, sodium trans-bis-indazoletetrachlororuthenate (KP1339) ha entrado a ensayos clínicos. NAMI-A es atractivo por su habilidad de atacar tumores metastásicos sólidos, mientras que KP1339 ataca preferentemente a tumores neuroendócrinos (Heffeter et al., 2013; Liang et al., 2017; Novohradský et al., 2014).

Varios de los blancos donde actúan estos organocompuestos de rutenio son enzimáticos, pues hay estudios de espectrometría de masas que indican formación de aductos con proteínas, como lo son la catepsina B, glicoproteína P y la tioredoxina reductasa (Gasser et al., 2011; Groessl et al., 2010).

## **24 Compuestos organometálicos de ferroceno**

El descubrimiento de la estructura del ferroceno por Wilkinson y Fisher en 1952 ha sido un punto clave para la química organometálica moderna, ya que fue el primer compuesto organometálico con propiedades antiproliferativas reportado (Salmain & Metzler-Nolte, 2008).

Los organometales con propiedades anticancerígenas derivados de ferroceno comprenden una pequeña porción de toda la investigación medicinal sobre estos organofármacos (Salmain & Metzler-Nolte, 2008). La actividad anticancerígena de los compuestos que contienen ferroceno, fue primeramente investigada en 1978 por Brynes al sintetizar nuevos compuestos de ferroceno con poliaminas, los cuales se unen fuertemente a ácidos nucleicos. Estas moléculas presentaron una baja pero significativa actividad antitumoral en leucemia linfocítica de ratón (Fiorina et al., 1978).

En 1984, Köpf-Maier realizaron las primeras investigaciones de la actividad de las sales de ferroceno, que fueron inyectadas intraperitonealmente con solución salina. Observaron que los ratones hembras CF1 con carcinoma de Erlich, lograban un rango de supervivencia hasta del 100% dependiendo de la dosis de [Fc]<sup>+</sup> administrada (Patra & Gasser, 2017).

Los derivados de ferroceno han atraído un interés significativo como candidatos de fármacos anticancerígenos ya que es posible modificar su estructura añadiéndole infinidad de moléculas. La naturaleza del ferroceno como aromático estable, de baja toxicidad, bajo costo y con capacidad redox reversible le confiere distintas propiedades. Algunos ejemplos de estas modificaciones estructurales

son las siguientes: ferrocifen con actividad antiproliferativa en células de cáncer de mama; raloxifen que ha revelado actividad citotóxica contra diversas líneas celulares tumorales (mama, ovario, cérvix, pulmonar y colorectal); ferrocenilflavona, que ha mostrado baja toxicidad en melanoma murino B16, pero ha mostrado excelentes resultados como agente antivasculador; grupos de ferroceno que han sido unidos a péptidos y a azúcares que presentan actividad anticancerígena, etc. Tales modificaciones pueden ser grupos orgánicos de un fármaco existente, acción conocida como bioisosterismo. Estas y más modificaciones de moléculas se pueden observar en la Figura (Jaouen et al., 2015; Patra & Gasser, 2017).

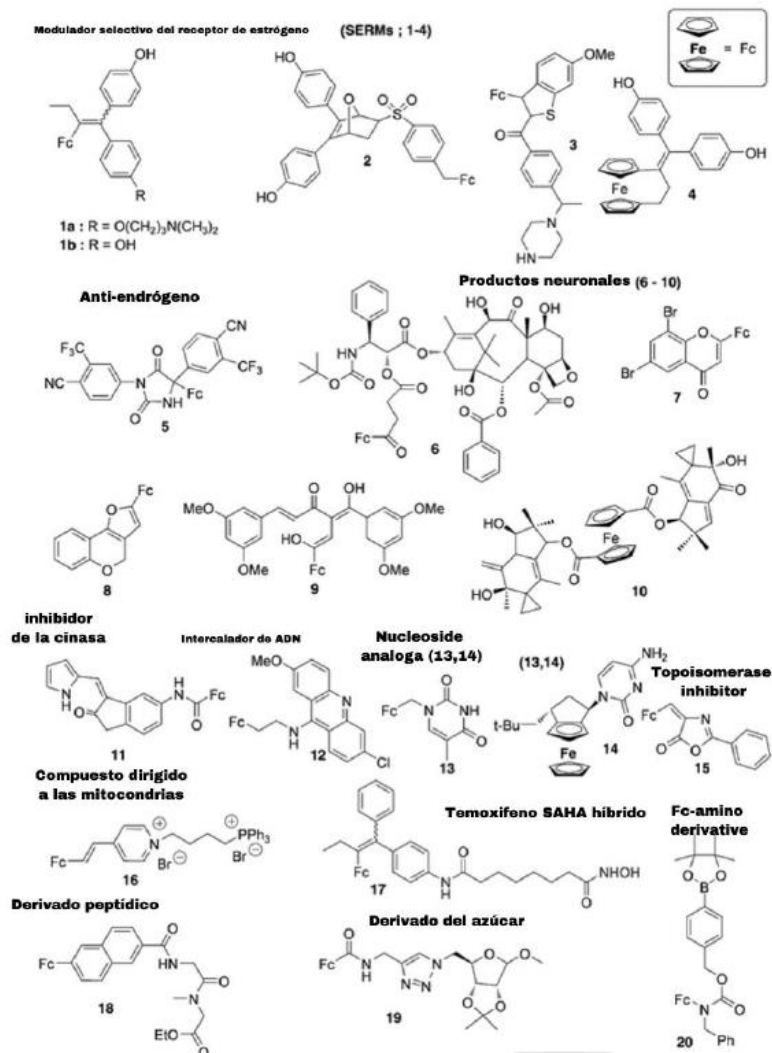


Figura 11. Organometales con actividad biológica a base de ferroceno. Tomada de Jaouen, Vessières, & Top, 2015



El rol de los grupos ferroceniles en la actividad biológica, según Patra & Gasser, se puede explicar de 3 diferentes formas, uno es debido a su forma de barril de metaloceno, (Figura), ya que le confiere la posibilidad de rellenar una cavidad hidrofóbica de una manera donde un grupo fenil u otra molécula heteroaromática no puede hacerlo y por tanto puede interactuar de mejor manera con las proteínas, por ejemplo, inhibiéndolas.

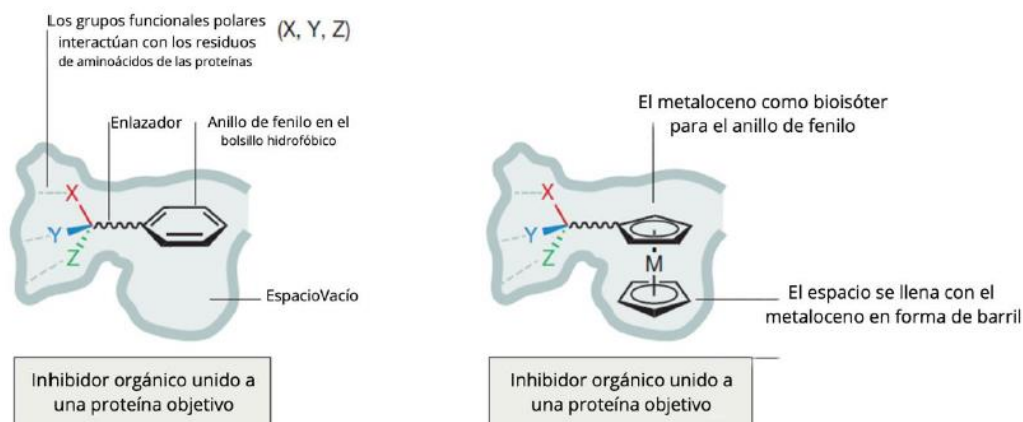


Figura 12. Bioisosterismo del ferroceno. Imagen modificada de Patra & Gasser, 2017

El segundo mecanismo propuesto, (Figura ), es la unión del ferroceno con metales de transición para formar complejos multimetálicos para ejercer una acción multimodal. Los derivados de ferroceno, se asume que están direccionados hacia múltiples organelos, diferentes proteínas, ADN o tienen acciones terapéuticas multimodales que resultan en un efecto aditivo o sinérgico.

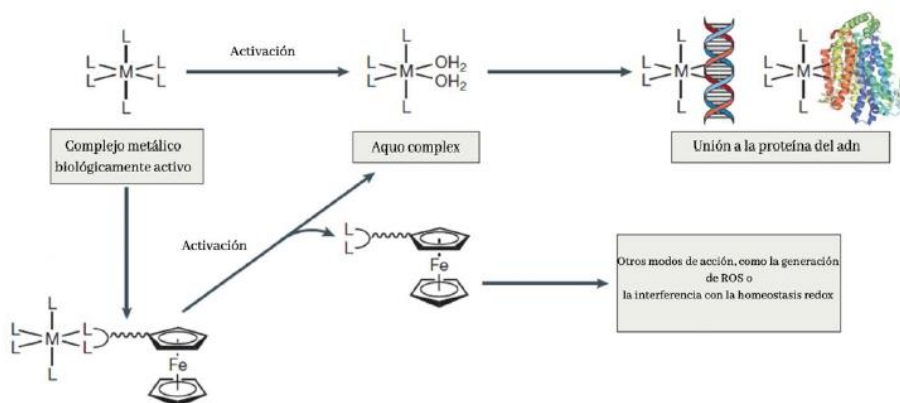


Figura 13. Compuestos heterometálicos con ferroceno con blancos multimodales. Imagen modificada de Patra & Gasser, 2017.

Por ejemplo, el *cis*-[PtCl<sub>2</sub>(2-ferrocenylaminoethane)<sub>2</sub>] muestra mejor actividad contra células de cáncer de colon WiDr (IC<sub>50</sub>/48h = 2.3 ± 0.52 μM) comparado con el *cis*-platino (IC<sub>50</sub>/48h = 26 ± 5.6 μM) (Nieto et al., 2012). Algunos estudios en otros compuestos multimetálicos con platino y ligandos de ferroceniliminoalcoholes, señalan que estos metales inducen la translocación de la proteína FOXO3a del citosol al núcleo activando caspasas e induciendo apoptosis (Cortés et al., 2014). Esto debido a que FOXO3a es un factor de transcripción y un supresor de tumores que solamente puede actuar cuando está en el núcleo. En las células cancerosas, la enzima fosforilada AKT está sobre regulada por lo que FOXO3a es rápidamente fosforilado, moviéndose del núcleo al citoplasma, perdiendo así su actividad. Aparentemente el complejo multimetálico con platino y ferroceno, Figura , interfiere con la fosforilación de AKT, y suprime la fosforilación de FOXOa3 junto con su traslocación al citoplasma (Patra & Gasser, 2017).

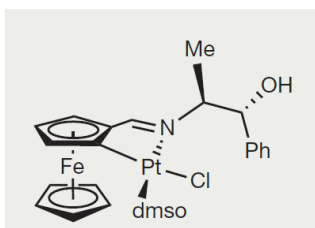


Figura 14. Compuesto multimetálico de platino y ferroceno, modificado de Cortés et al, 2014

Este compuesto es capaz de inducir muerte celular por apoptosis intrínseca, la cual está detonada por la liberación del citocromo c de la mitocondria y la formación del apoptosoma (Cortés et al., 2014).

El tercer mecanismo propuesto, es que el ferroceno actúe como una antena en la metaloquimioterapia fotoactivada (Figura ). Se han estudiado compuestos con Cu, Zn, Pt, Ru y Fe en complejos con 1,10-phenanthroline, dipyrído[3,2-f:2',3'-h]quinoxaline o dipyrído[ 3,2-a:2',3'-c] phenazine junto con 4'-ferrocenyl-2,2':6',2''-terpyridine (Fc-tpy) y la sal trimetálica de [Zn(Fc-tpy)<sub>2</sub>][ClO<sub>4</sub>]<sub>2</sub> Figura, que genera toxicidad con una IC<sub>50</sub> de 49 μM en la oscuridad y 7 μM después de la exposición de luz en el espectro visible, produciendo un índice fototóxico (PI= IC<sub>50</sub> dark/ IC<sub>50</sub> luz) de 7 en la línea celular de cáncer HeLa (Maity et al., 2010). Cabe señalar que el compuesto sin la antena de ferroceno no es tóxico ni en la oscuridad ni en la luz hasta una concentración de 50 μM.

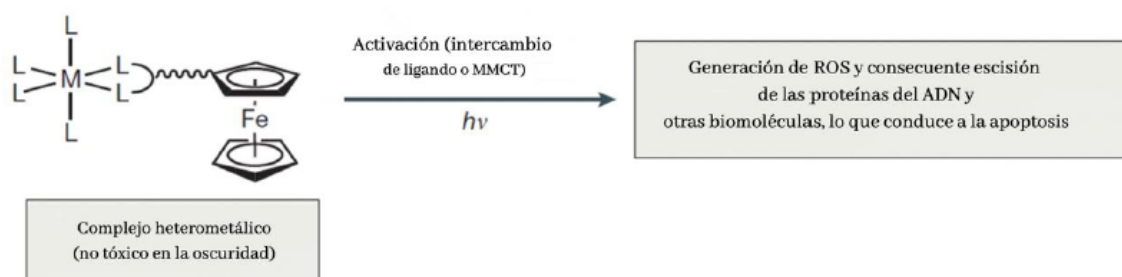


Figura 15. Ferroceno como antena en metaloquimioterapia fotoactivada, modificado de Patra & Gasser, 2017

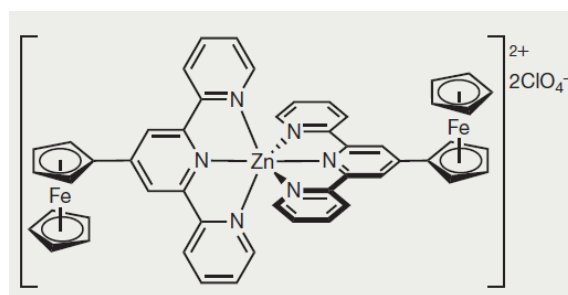


Figura 16. Compuesto trimetálico de zinc y ferroceno, modificado de Patra & Gasser, 2017

Otro compuesto que ha dado excelentes resultados de fototoxicidad es el [Pt (Fc-tpy) (N-propargylcarbazolato)]Cl en queratinocitos humanos inmortalizados HaCaT con una IC<sub>50</sub> de 85  $\mu$ M en la oscuridad y 10  $\mu$ M después de la exposición de luz (PI =8.5), Figura. De esta molécula se ha estudiado su localización subcelular, encontrando, gracias a la eficiencia de absorción del complejo, que se acumula en el núcleo y en el citosol. El estudio de su mecanismo de acción ha revelado la importancia de la fotooxidación del núcleo de ferroceno (Fc<sup>+</sup>) que actúa como un fotoiniciador del centro de platino, generando ROS, incluidos radicales  $\cdot$ OH. Estas ROS, reaccionan con el ADN y con proteínas causando la apoptosis de las células cancerosas (Mitra et al., 2014).

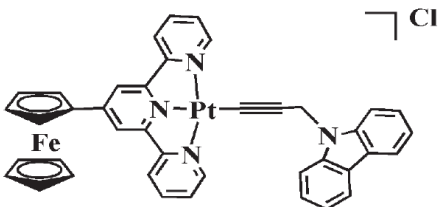


Figura 17. Compuesto con centro de platino y ferroceno, modificado de Mitra et al., 2014

En cuanto a la toxicidad de la molécula de ferroceno *per se*, es importante señalar que su toxicidad es baja. En 1969, Yeary llevó a cabo un estudio *in vivo*, donde diariamente administró altas dosis de ferroceno en un periodo de tiempo, sin observarse un efecto citotóxico (Patra & Gasser, 2017).

Normalmente, en mamíferos, el hierro es transportado y guardado en proteínas específicas para prevenir reacciones anormales de hierro-oxígeno. Sin embargo, cuando las interacciones hierro-oxígeno son permitidas (eritrocitos, hemoglobina), enzimas como la superóxido dismutasa y la catalasa actúan para finalizar la propagación de la reacción en cadena de radicales libres provocado por el anión superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ). Por lo tanto, se cree que los efectos nocivos de los iones hierro están relacionados con su capacidad para generar especies reactivas de oxígeno, las cuales podrían oxidar lípidos, proteínas y ADN (Acevedo-Morantes et al., 2012; Osella, 2000) Es importante señalar que muchos agentes anticancerígenos actúan a través de daño biológico causado por los metabolitos que generan radicales libres (Halliwell & M.C. Gutteridge, 2015).

## 25 Selenoderivados: Ferrocenilselenoamida y rutenocilselenoamida

Durante la década pasada, los compuestos con selenio han atraído considerablemente la atención por su potencial en la actividad biológica, ya sea como antivirales, antihipertensivos, antimicrobianos, y especialmente en su actividad antitumoral (Gutiérrez Fernández et al., 2012). De los derivados de selenio con actividad antitumoral se encuentra la selenita, que han mostrado efectos en la inhibición de la expresión del receptor de andrógenos y del antígeno específico prostático por andrógenos en líneas celulares de cáncer de próstata (Nox, 2008).

El selenio es un componente esencial de las selenoenzimas funcionales requeridas para un estado de salud óptimo. Se sabe que estas enzimas, como la glutatión peroxidasa, yodotirosina desyodinasas y

la tioredoxina reductasa, tienen un papel clave para proteger al organismo de daño oxidativo, generando así un balance redox.(Nox, 2008; Spectus, 2010).

El grupo de Gutiérrez Fernández, et al., logró ligar el esqueleto de ferroceno a un grupo funcional conteniendo selenio (selenoamida), generando así un nuevo compuesto llamado ferrocenilselenoamida, que resultó citotóxico para líneas celulares de colón y cerebro. Dado lo anterior, la síntesis de estos nuevos compuestos, así como las rutenocilselenoamidas, prometen ser candidatos para blancos moleculares contra líneas cancerosas. (Gutiérrez Fernández et al., 2012).

## **26 Planteamiento del problema**

A la fecha, el glioblastoma es el tumor maligno más común dentro del grupo de tumores primarios del sistema nervioso central, a nivel mundial esta enfermedad afecta a 3.5 personas por cada 100 mil habitantes y desafortunadamente con las quimioterapias actuales, temozolomida, la esperanza de vida una vez diagnosticado es de 15 meses aproximadamente. Por lo tanto, el descubrimiento de nuevas moléculas que afecten procesos clave, como viabilidad y metabolismo, son cruciales para mejorar la esperanza de vida en pacientes que presentan esta enfermedad. Este proyecto se enfoca en estudiar el efecto de la ferrocenilselenoamida, una molécula nueva y novedosa, en procesos celulares clave donde se espera que los resultados obtenidos puedan ser utilizados para futuras terapias en contra de células tumorales de glioblastoma.

## **27 Hipótesis**

Se sabe que compuestos metálicos a base de selenio y hierro tienen actividad citotóxica, por lo tanto, se espera que la combinación de ambos elementos en una misma molécula inhiba diversos pasos del metabolismo y diversos procesos biológicos en células tumorales de glioblastoma.

## **28 Objetivos**

### **28.1 Objetivo general**

Estudiar el efecto de moléculas organometálicas compuestas de rutenio y hierro sobre la viabilidad y el metabolismo de diversas líneas celulares tumorales.

## 28.2 Objetivos Particulares

- 28.2.1 Comprobar la capacidad citotóxica de los compuestos organometálicos en líneas celulares de glioblastoma.
- 28.2.2 Realizar ensayos de migración y proliferación en células donde los compuestos hayan tenido actividad antitumoral.
- 28.2.3 Medir la concentración intracelular de ROS después de la exposición a los compuestos.
- 28.2.4 Evaluar el efecto de los fármacos en el metabolismo celular y cuantificar lactato, glutamina y glutamato generados por enzimas clave en la tumorigénesis del glioblastoma.
- 28.2.5 Analizar el posible mecanismo de muerte por el que actúan las moléculas organometálicas.

## 29 Materiales y Métodos

### 29.1 Cultivo celular

Las células de glioblastoma humano **U251 y LN229** y adenocarcinoma pulmonar humano **SKLU-1**, fueron mantenidas en RPMI 1640 suplementado con 2.0 g/L de NaHCO<sub>3</sub> a pH de 7.4, 10 % de SFB y 1% de penicilina/estreptomicina neuroblastoma murino. Las líneas de neuroblastoma, **Neuro-2A**, adenocarcinoma epitelial uterino humano, **HeLa**, y de riñón embrionarias humanas **HEK-293** fueron mantenidas en DMEM suplementado con 3.7 g/L de NaHCO<sub>3</sub> a pH de 7.4, 10 % de SFB y 1% de penicilina/estreptomicina. Los cultivos celulares fueron incubados a 37°C con una atmósfera al 5% de CO<sub>2</sub> (GIBCO, 2018).

### 29.2 Determinación de la viabilidad celular a través el ensayo de MTT

La actividad metabólica se determinó mediante la adaptación del ensayo de MTT de MERCK. Las células fueron sembradas en cajas de 96 pozos, a una concentración de  $8 \times 10^4$  células/mL, con medio RPMI 1640 al 10% SFB y se incubaron por toda la noche. Posteriormente se retiró el sobrenadante, se añadió medio fresco RPMI 1640 al 1%, con concentraciones crecientes de las moléculas con ferroceno, rutenoceno y temozolomida.

Las concentraciones usadas para ferrocenilselenoamida al igual que para la rutenocilselenoamida fueron de 1, 3, 5 10, 20, 50 y 100  $\mu$ M; mientras que, para la temozolomida fueron de 10, 20, 50, 100, 150, 200 y 500  $\mu$ M. Después de 24 y 72 h de exposición a los compuestos, se retiró el medio de cada pozo y se añadió una solución que contenía 45  $\mu$ L de medio fresco RPMI-1640 al 1% y 5  $\mu$ L de MTT (5mg/mL). Se dejaron incubar las cajas en oscuridad por 4 horas a 37°C con una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Una vez transcurrido ese tiempo se les quitó el medio con MTT y se agregó 50  $\mu$ L de DMSO a cada pozo, esto con el fin de disolver los cristales de formazán generados.

Las mediciones fueron llevadas a cabo a una longitud de onda de 570 nm. Dos controles fueron utilizados por cada experimento: 1) IC<sub>0</sub> (representó el 100% de crecimiento), consistió en células sin los complejos con ferroceno, rutenoceno y sin el fármaco temozolomida, 2) células creciendo a la máxima cantidad de vehículo utilizado para disolver cada compuesto en los tres tratamientos diferentes, dimetilsulfóxido (DMSO) al 0.2%, metanol al 0.2% y etanol al 0.2%, esto para determinar el efecto citotóxico en el medio. Los cálculos de la IC<sub>50</sub> (50% de la concentración inhibitoria), fueron

analizados por un ajuste de curva dosis-respuesta usando Prism 7.0 (GraphPad, San Diego, CA). La absorbancia fue medida usando un lector de placas Cytation 5 Biotek. (MERCK, 2019).

### 29.3 Migración celular

Las células de glioblastoma humano U251 y las células de riñón embrionarias humanas HEK293 fueron sembradas en cajas Petri hasta que alcanzaron al menos un 60% de confluencia. Posteriormente se retiró el medio, se lavó con PBS pH 7.4 y se agregó 1mL tripsina para despegar a las células. Después de 5 min en incubación (37°C, 5% CO<sub>2</sub>), se neutralizó la tripsina con 1 mL de medio y se realizó el conteo celular en una cámara de Neubauer con azul de tripano. Se sembraron 1x10<sup>5</sup> células en cajas de 12 pozos y se incubaron por 24 h a 37°C en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>.

Una vez alcanzada la densidad celular adecuada se realizó una herida con una punta de micropipeta en cada pozo, seguido de un lavado con PBS pH 7.4 y finalmente se añadió medio (control vehículo), 6.5 µM de ferroceno (HEK293 y U251) o 100 µM de temozolomida (U251) respectivamente.

Se realizaron una serie de imágenes de cada pozo a las 0, 24, 48 y 72h en un lector de placas multimodal (Cytation 5, Biotek) utilizando un objetivo 4X en campo claro.

Para el cálculo de área de la migración celular, se utilizó el programa ImageJ para cuantificar el área de cada herida efectuada a los diferentes tiempos establecidos comparando el control con cada tratamiento, para así poder efectuar la relación de porcentaje de cierre. (Cheng & Zygourakis, 2011).

### 29.4 Proliferación celular

Las líneas celulares U251 y HEK293 fueron sembradas en cajas Petri hasta alcanzar 60% de confluencia. Se les realizó el mismo procedimiento para despegar y contar las células que en migración. Se sembraron 1x10<sup>4</sup> células en cajas de 96 pozo y se incubó por 24 h a 37°C en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>.

Transcurrido el tiempo indicado, se retiró el medio y se añadió medio fresco con las concentraciones siguientes: 0 µM (control vehículo), 3.7 µM y 6.5 µM de ferrocenilselenoamida. (Feoktistova et al., 2016).



## 29.5 Tinción con cristal violeta

Posteriormente se llevó a cabo la tinción con cristal violeta, utilizando 4 diferentes tiempos de exposición de tratamiento: 0, 24, 48 y 72h. En cada diferente tiempo se retiró el medio de cada pozo con los diferentes tratamientos, se añadió 50  $\mu\text{L}$  de una solución al 0.5% de cristal violeta e incubó por 30 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo de incubación, se retiró la solución de tinción y se realizaron 3 lavados con 100  $\mu\text{L}$  agua destilada a cada pozo. Al final de los lavados, se retiró el agua destilada de cada pocillo.

Para solubilizar y medir la absorbancia del cristal violeta, se añadieron 150  $\mu\text{L}$  de metanol a cada pocillo y se incubaron las cajas por 30 minutos a temperatura ambiente. Por último, las cajas fueron llevadas a un lector de placas para efectuar una medición de absorbancia a una longitud de onda de 570 nm. (Feoktistova et al., 2016).

## 29.6 Metabolómica

Las líneas celulares U251 y HEK293 fueron sembradas en cajas Petri hasta que alcanzaron una densidad del 80%. La línea celular tumoral fue tratada durante 24 h con la  $\text{IC}_{25}$  a 24 h de ferrocenilselenoamida (3.5  $\mu\text{M}$ ) o con una concentración de 100  $\mu\text{M}$  de temozolomida. Cada experimento fue por triplicado.

La línea no tumoral también fue tratada por 24 h con la  $\text{IC}_{25}$  de ferrocenilselenoamida (3.5  $\mu\text{M}$ ) o con la misma concentración, pero a 72 h.

Pasado el tiempo establecido para cada tratamiento, se les realizaron dos diferentes procesos para el análisis de metabolitos tanto extracelulares como intracelulares.

## 29.7 Metabolitos extracelulares

Se colectó todo el medio de cultivo de cada tratamiento en tubos de centrifuga de poliestireno de 15 mL y se centrifugó a 3500 rpm/5 min. Se recuperaron 500  $\mu\text{L}$  del sobrenadante, se colocaron en tubos de 1.5 mL y se les añadió 500  $\mu\text{L}$  de acetonitrilo grado HPLC. Posteriormente, estos tubos se centrifugaron a 14500 rpm/ 5 min y todo el sobrenadante fue colocado en un tubo de centrifuga nuevo y fue llevado a evaporación bajo flujo de nitrógeno o en una cámara de vacío.

## 29.8 Metabolitos intracelulares

Una vez retirado el medio de cultivo a las cajas, se les realizó un lavado con PBS pH 7.4. Posteriormente se les añadió 1 mL de PBS, y se efectuó un raspado para despegar las células. Las células fueron contadas en una cámara de Neubauer con azul de tripano y fueron colectadas en un tubo de centrifuga. Se les colocó en un baño de hielo por 5 min para posteriormente añadirles 1 mL de acetonitrilo acuoso. Se sonicaron por 20 min y se llevaron a centrifugación, 14500 rpm/ 5 minutos. Todo el sobrenadante fue colocado en un tubo de centrifuga nuevo y fue llevado a evaporación bajo flujo de nitrógeno o en una cámara de vacío.

## 29.9 Análisis de RMN

Una vez evaporadas todas las muestras, los metabolitos son disueltos en 650  $\mu$ L de agua deuterada con TSP 0.02 mM y 0.1mM, para muestras intracelulares y extracelulares respectivamente. Fueron sonicados por 20 min y se llevaron a centrifugación a 14500 rpm/ 5 min. Después, se colocaron 500  $\mu$ L de cada muestra en tubos de RMN (Brucker AVANCE III HD 700MHz) para adquirir los espectros.

## 29.10 Análisis de Componentes Principales (PCA)

Es un método no supervisado con el objetivo de encontrar direcciones que mejor expliquen la varianza en los datos en el eje X, sin referirse a la etiqueta de clase (eje Y). Así, los datos son resumidos en menos variables llamadas “*scores*”, que son promediadas con las variables originales. Es decir, esta técnica describe un conjunto de datos en términos de nuevas variables “componentes”, no correlacionadas y disminuir la dimensionalidad de un conjunto de datos.

### 29.11 Análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales (PLS-DA)

Es un método supervisado que usa técnicas de regresión multivariante para extraer mediante combinación lineal de las variables originales (X) la información que puede predecir la pertenencia a la clase (Y). Es decir, reduce las variables a un conjunto más pequeño de componentes no correlacionados y realiza una regresión de mínimos cuadrados sobre estos componentes, en lugar de hacerlo sobre los datos originales.

### 29.12 Cuantificación de Especies Reactivas de Oxígeno

#### 29.12.1 Peróxido de Hidrogeno $H_2O_2$

De acuerdo con el Kit de ensayo de peroxidasa/peróxido de hidrógeno Amplex de Invitrogen™ En una caja de 96 pozos para fluorescencia, se sembraron  $5 \times 10^3$  células en cada pozo, se les añadió medio hasta alcanzar un volumen de 100  $\mu$ L y se incubaron a 37°C a 5%  $CO_2$  por 24 h. Después se retiró el medio, y a la mitad de los pozos se les colocó el tratamiento con ferrocenilselenoamida a una concentración de 6.5  $\mu$ M por 24, y 48h con una concentración de 3.7  $\mu$ M por 72 h. La otra mitad fue utilizada como control de  $[H_2O_2]$  basales. En ambos casos, el volumen final fue de 100 $\mu$ L de medio.

Posteriormente se retiró el medio, se lavó dos veces con PBS, y se dejó cada pozo con 50  $\mu$ L de este. Se le midió la absorbancia a cada pozo a una longitud de onda de 600 nm. Finalmente, se añadieron 50  $\mu$ L del kit de ensayo de peroxidasa/peróxido de hidrógeno Amplex® Red a cada pozo, para un volumen final de 100  $\mu$ L, Se excitó la resorufina generada a 571 nm, y se efectuó la lectura de esta a una longitud de onda de 585 nm. Los resultados se analizaron y se normalizaron dependiendo de la cantidad de  $H_2O_2$  con respecto al número de células.

Para esta metodología fue necesario efectuar dos curvas, una de concentración de  $H_2O_2$ , que fue de 0 nm hasta 1200 nm, esto con el fin de determinar la concentración real de  $H_2O_2$  generado por las células. Y la segunda fue de cantidad de células, medido a una densidad óptica de 600 nm, que fue de  $1 \times 10^3$  células hasta  $1 \times 10^5$  células.

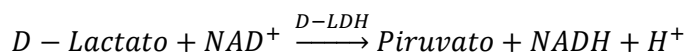
### 29.12.2 Determinación de anión superóxido

En este experimento se utilizó el reactivo MitoSOX™ Red mitocondrial superoxide indicator\*for live-cell imaging\* (M36008) de Invitrogen™. Este ensayo se basa en la detección específica del anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) el cual es un bioproducto de la fosforilación oxidativa, dirigiéndose específicamente a las mitocondrias de las células vivas.

En una microplaca de 96 pozos para fluorescencia, se añadió a cada pozo 100  $\mu$ L de poli-l-lisina por 30 minutos. Se retiró la poli-l-lisina, se lavó con agua destilada y se dejó secar por 20 minutos. Posteriormente se sembraron  $3 \times 10^4$  células de U251 en medio RPMI 1640 a cada pozo, incubándose por 24h a 37 °C en una atmósfera de 5%  $CO_2$ . A las 24 h, se retiró el medio, y se añadió medio fresco con tratamiento, ferroceno  $IC_{50}$ ,  $IC_{25}$ ,  $IC_{12.5}$  y temozolomida 100  $\mu$ M. Después de 24 y 72 h, las células fueron lavadas con 100  $\mu$ L del amortiguador HBSS/Ca/Mg. Por último, se añadió el reactivo e MitoSOX™ a una concentración de 5  $\mu$ M y se dejó incubando por 10 min a 37 °C protegida de la luz. A los 10 min, se lavó la placa 2 veces con el amortiguador HBSS/Ca/Mg, se agregó 100  $\mu$ L del amortiguador y se leyó la microplaca a una Ex/Em: 510/580 nm.

### 29.13 Determinación de lactato

Este ensayo, es una adecuación de R.B. Brand de 1982 y se basa en la detección espectrofotométrica de la nicotinamida adenina dinucleótido, NADH, producido por la l-lactato deshidrogenasa al catalizar lactato para formar piruvato, acoplada a una reducción de  $NAD^+$  a NADH en un ambiente con pH alcalino. Se utiliza hidracina para forzar la reacción a la generación de piruvato.



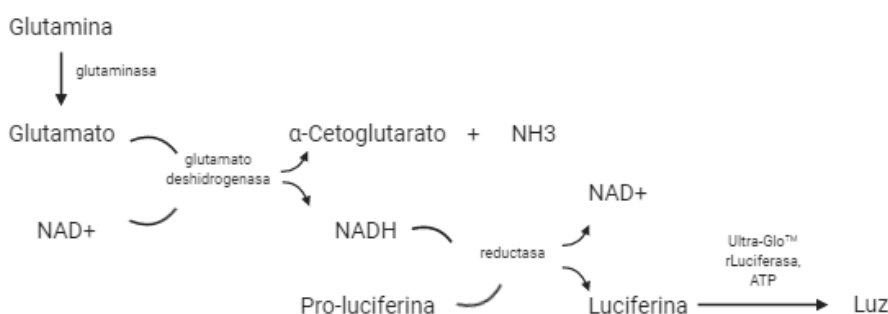
Serie de reacciones 1. Generación de Piruvato por la D-LDH

Se sembraron  $5 \times 10^3$  células tanto de glioblastoma U251 como de células renales humanas HEK293 en una caja de 96 pozos durante 24h en incubación a 37°C en una atmósfera de 5%  $CO_2$ . Posteriormente fueron tratadas con la molécula con ferroceno a concentraciones de  $IC_{50}$ ,  $IC_{25}$ ,  $IC_{12.5}$  y temozolomida 100  $\mu$ M respectivamente. Una vez realizado lo anterior, se sustrajo del medio de cultivo de cada pocillo una alícuota de 5  $\mu$ L a 24 y 72 h. Los 5  $\mu$ L fueron transferidos a una microplaca de 96 pozos adecuadas para UV. A cada muestra se le añadió 193  $\mu$ L del amortiguador NAD-glicina-

hidracina y 2  $\mu\text{L}$  de la enzima l-lactato deshidrogenasa. Se realizo a la par una curva estándar de lactato de 0  $\mu\text{M}$  a 2000  $\mu\text{M}$ . Una vez realizado lo anterior, se incubó la placa a 37 °C por 1h con agitación leve. Al término de la incubación, se leyó la placa a 340 nm.

#### 29.14 Determinación de glutamina y glutamato

El fundamento de este ensayo está basado en la conversión de glutamina a glutamato por la enzima glutaminasa, seguido de la oxidación de glutamato y producción de NADH, las cuales están acoplados a un sistema de detección bioluminiscente de NADH.



Serie de reacciones 2. Cuantificación de luminiscencia a partir de glutamina y glutamato

Se sembraron  $5 \times 10^3$  células de U251 en una placa de 96 pozos, se dejaron incubando por 24 horas a 37 °C en una atmósfera de 5%  $\text{CO}_2$ . Posterior a ello se realizó el tratamiento con la  $\text{IC}_{50}$  de la ferrocenilselenoamida durante 24 y 72h. De cada condición se colectó una muestra de 2  $\mu\text{L}$  del medio de cultivo de cada pocillo y se diluyó en 98  $\mu\text{L}$  de PBS. De dicha dilución se tomaron 25  $\mu\text{L}$  y se colocaron en una placa blanca de 96 pozos para luminiscencia. Para las curvas estándar (que fueron de 0.70  $\mu\text{M}$  a 70  $\mu\text{M}$ ) se transfirieron 25  $\mu\text{L}$  de glutamato, al igual que 25  $\mu\text{L}$  de glutamina y finalmente 25  $\mu\text{L}$  del control negativo (solamente PBS). A la mitad de las muestras se les añadió 25  $\mu\text{L}$  de amortiguador con glutaminasa (detección de glutamina) y a la otra mitad se les añadió solamente el amortiguador sin glutaminasa (detección de glutamato). Se agitó la placa por 60s levemente y se incubó a temperatura ambiente por 30 min.

Posteriormente, a cada pozo de la placa, se le añadió 50  $\mu\text{L}$  del reactivo de detección de glutamato, el cual contiene la solución de detección de luciferina, la reductasa, la pro-luciferasa, la enzima

glutamato deshidrogenasa y el NAD. Se volvió a agitar la placa por 60s y se incubó por 1h a temperatura ambiente. Finalmente se leyó la luminiscencia de cada pozo en un luminómetro. (Promega, 2017).

#### 29.15 Western blot

Se sembraron  $3 \times 10^5$  de células U251 por pozo en una placa de 6 y se trataron con ferroceno  $IC_{50}$  o temozolomida  $100 \mu M$ ) por 24h. El lisado de proteínas se separó por electroforesis en geles de SDS-PAGE al 10% a 90v. Los geles se transfirieron a membranas de PVDF (Millipore, USA) durante 2 horas (120v en cámara de hielo en condiciones húmedas). Las membranas se bloquearon con 5% de leche en polvo baja en grasa a temperatura ambiente por 1 h. Posteriormente se incubaron con los anticuerpos primarios (ratón, conejo y cabra) a  $4^{\circ}C$  por toda la noche. Finalmente se incubaron con anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano por 1 h. Para corregir las diferencias de proteína total cargada en cada carril, se normalizó con GAPDH. Se detectó la señal de quimioluminiscencia exponiendo las membranas a placas sensibles a la luz, utilizando la señal generada por el sustrato Immobilon Western HRP (Millipore, USA).

## 30 Resultados

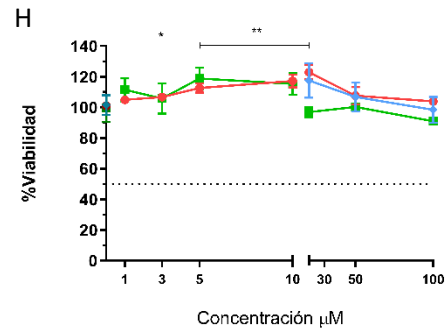
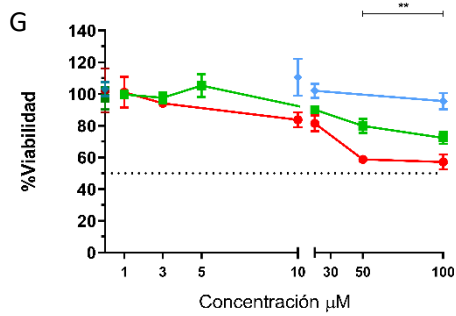
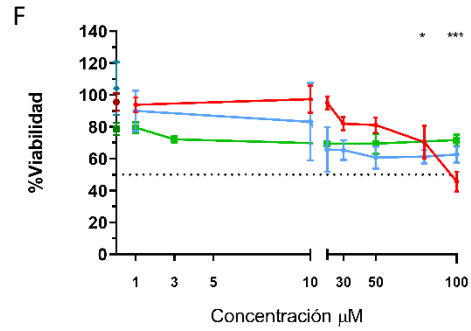
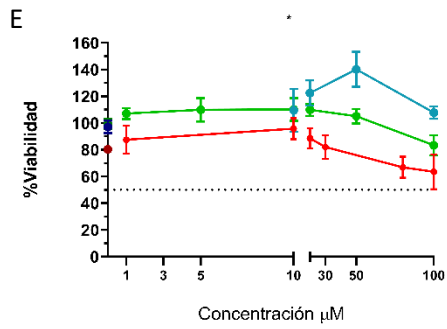
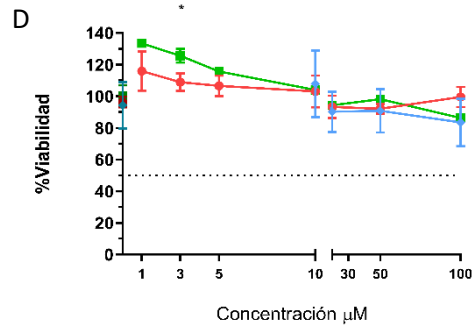
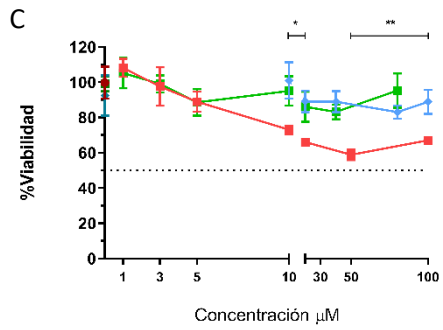
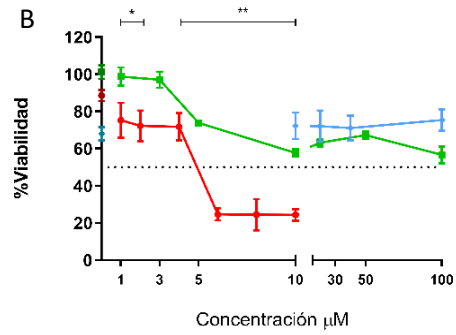
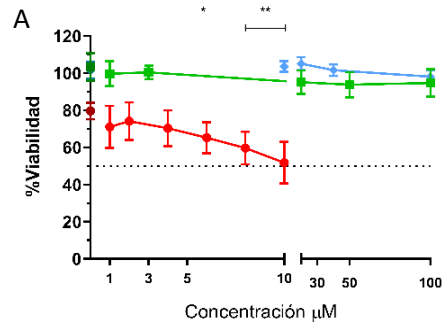
### 30.1 Citotoxicidad de los compuestos organometálicos.

Se realizó un tamizaje con diferentes líneas celulares para determinar la citotoxicidad del compuesto organometálico de hierro o rutenio. Se observó una excelente actividad contra la línea de glioblastoma humano U251 a 24 y 72 h, solo con la molécula que contenía al ferroceno, aproximadamente de 6.5 y 3.7  $\mu\text{M}$  respectivamente. Al comparar con el tratamiento de elección para este tipo de tumores, la temozolomida, observamos que la  $\text{IC}_{50}$  no pudo ser determinada con las concentraciones utilizadas; posiblemente se establezca a concentraciones mayores a 100  $\mu\text{M}$ . Al utilizar el compuesto organometálico con rutenio, encontramos que no presentó actividad citotóxica importante, ya que ni a las 24 o 72h inhibe el crecimiento celular, aun utilizando la más alta concentración que fue de 100 $\mu\text{M}$ . Por tal motivo, en experimentos posteriores, se decidió trabajar únicamente con la organomolécula a base de hierro. (Fig. 18 y Tabla 3).

Por otro lado, en las líneas celulares LN-229 y Neuro-2a, (ambas líneas de tumores cerebrales), ninguno de los tratamientos con las concentraciones y tiempos utilizados tuvieron efecto alguno sobre la viabilidad celular. Esto se logra observar ya que a pesar de trabajar con una máxima concentración de 100  $\mu\text{M}$  tanto a 24 como a 72h, no es posible calcular la  $\text{IC}_{50}$

En el caso de la línea celular de tejido sano HEK-293 las moléculas no presentaron actividad ( $\text{IC}_{50} > 100 \mu\text{M}$ ) en ninguno de los tiempos señalados ni a ninguna de las concentraciones utilizadas.

Tanto en la línea de adenocarcinoma pulmonar SKLU como en la de adenocarcinoma epitelial uterino HeLa, ambos organocompuestos muestran un efecto en la viabilidad celular después de 72 h con una  $\text{IC}_{50}$  menor a 10  $\mu\text{M}$  para ambas moléculas, pero solo para la línea celular HeLa, la molécula a base de ferroceno muestra actividad a 24h, pero con una  $\text{IC}_{50}$  al menos 8 veces menor comparada con la línea de glioblastoma (6.5  $\mu\text{M}$ ).





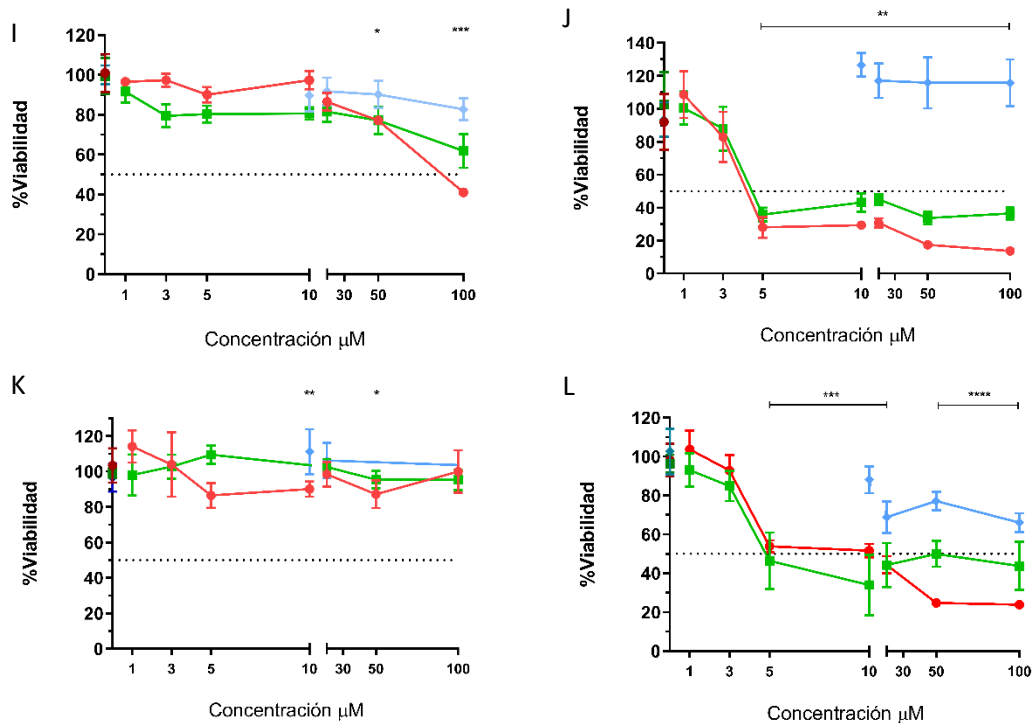


Figura 18. Ensayo de viabilidad de los compuestos: Ferrocenilselenoamida (rojo), rutenocilselenoamida (verde) a concentraciones de 1, 3, 5 10, 30, 50 y 100  $\mu\text{M}$  y Temozolomida (azul) a concentraciones de 10, 20, 50, 100, 150, 200 y 500  $\mu\text{M}$ , determinado mediante el ensayo de MTT. A y B) Células U251 con tratamiento a 24 y 72 h respectivamente. C y D) Células HEK 293 con tratamiento a 24 y 72 h respectivamente E y F) Células LN229 con tratamiento a 24 y 72 h, G y H) Células Neuro2A con tratamiento a 24 y 72 h, I y J) Células HeLa con tratamiento a 24 y 72 h, K y L) Células SKLU con tratamiento a 24 y 72 h. \* $p=0.01$ , \*\* $p<0.008$ , \*\*\* $p<0.002$  y \*\*\*\* $p>0.0001$

Tabla 3. Ensayo de viabilidad y cálculo de  $IC_{50}$  en distintas líneas celulares usando ferrocenilselenoamida (F), rutenocilselenoamida (R) y temozolomida (T), a 24h y 72h. Los valores de cada  $IC_{50}$  están dados en  $\mu\text{M}$ . \* $p=0.01$ , \*\* $p<0.008$ , \*\*\* $p<0.002$  y \*\*\*\* $p>0.0001$

Líneas celulares

| Compuesto | U251 |      | LN-229 |      | SKLU |      | Neuro-2a |      | HeLa  |      | HEK-293 |      |
|-----------|------|------|--------|------|------|------|----------|------|-------|------|---------|------|
|           | 24 h | 72 h | 24 h   | 72 h | 24 h | 72 h | 24 h     | 72 h | 24 h  | 72 h | 24 h    | 72 h |
| F         | 6.50 | 3.70 | >100   | >100 | >100 | 6.01 | >100     | >100 | 54.62 | 3.63 | >100    | >100 |
| R         | >100 | >100 | >100   | >100 | >100 | 4.04 | >100     | >100 | >100  | 3.49 | >100    | >100 |
| T         | >100 | >100 | >100   | >100 | >100 | >100 | >100     | >100 | >100  | >100 | >100    | >100 |

## 30.2 Ensayo de la ferrocenilselenoamida en la migración celular

Tomando en cuenta los resultados anteriores, se continuaron los estudios únicamente con la molécula organometálica con hierro en la línea celular U251 debido a que fue la que presentó mejor respuesta al tratamiento a los dos tiempos establecidos y con la  $IC_{50}$  más baja para ambos casos. Además de esta línea, se decidió utilizar la línea celular no tumoral HEK293, como control celular sano para poder comparar los tratamientos y así tener una idea más cercana a lo que líneas celulares sanas podrían enfrentarse con el tratamiento con la ferrocenilselenoamida.

El ensayo de migración se basa en la capacidad de las células de ocupar el espacio generado por la “herida” realizada en la superficie de la monocapa celular. Las células en el borde de la herida se moverán hacia el centro de la abertura para establecer nuevos contactos célula-célula cerrando así la “herida”.

En las células HEK293, (Figura A y Figura 20), se observa que a 24 y 48 h, el porcentaje de cierre de herida, comparando el control de vehículo con el tratamiento de ferrocenilselenoamida a una concentración de  $6.5 \mu\text{M}$ , no muestra significancia estadística, es decir, en estos grupos no existe diferencias en el porcentaje de cierre de la herida, por lo cual su capacidad migratoria no se ve afectada. Esto no sucede a 72 h, pues es aquí donde se nota un ligero avance en su tasa de migración ( $p=0.004$ ), aunque esta migración en términos de porcentaje no llega a los niveles basales que tiene la U251

En la línea celular de cáncer cerebral U251 podemos observar, (Figura B), que a 24 h con el tratamiento de ferrocenilselenoamida ( $6.5 \mu\text{M}$ ), la migración ha disminuido en comparación con el grupo control e inclusive con el que contiene temozolomida ( $100 \mu\text{M}$ ), mostrando una diferencia significativa ( $p=0,008$ ).

A 48 h, el comportamiento que efectúa la ferrocenilselenoamida sobre la migración en la línea celular tumoral es similar a la observada a las 24 h, aunque con una mayor significancia estadística entre los grupos de estudio ( $p=0.0001$ ). Para las 72 h, no fue posible medir el porcentaje de cierre con el tratamiento del organometal, debido a que las células en la monocapa se despegaron, (FiguraB). Durante este mismo periodo tanto en el control de vehículo como con la temozolomida, las células mantuvieron la monocapa en el pozo e inclusive cerraron por completo la herida a las 72 h.

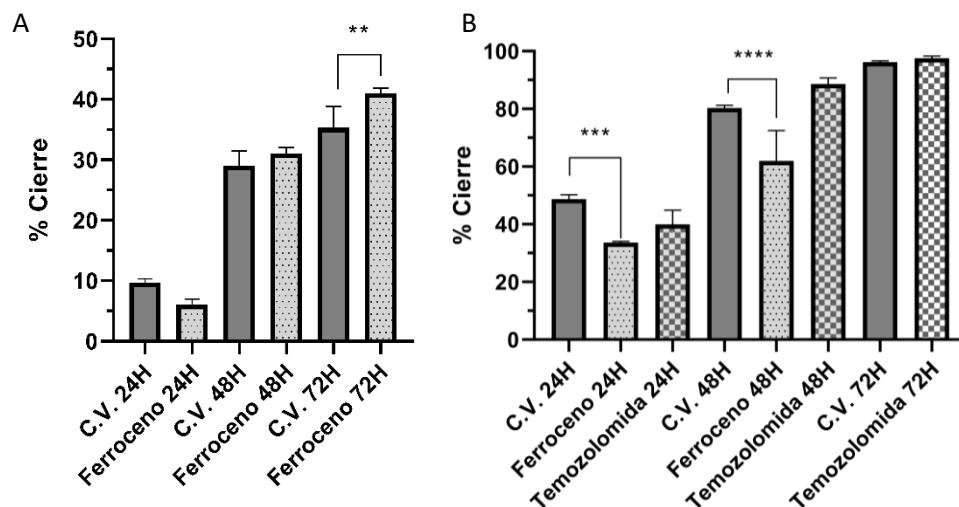


Figura 19. Cuantificación de migración celular en línea no tumoral HEK293 (A) y tumoral U251 (B). Comparación de cierre de herida entre las células estudiadas a diferentes tiempos. Tratamientos 0  $\mu\text{M}$  (Control Vehículo); 6.5  $\mu\text{M}$  de ferrocenilselenoamida y 100  $\mu\text{M}$  de temozolomida (Solo para U251).  $n=4$ ,  $**p=0.004$ ;  $***p<0.008$  y  $****p<0.001$ .

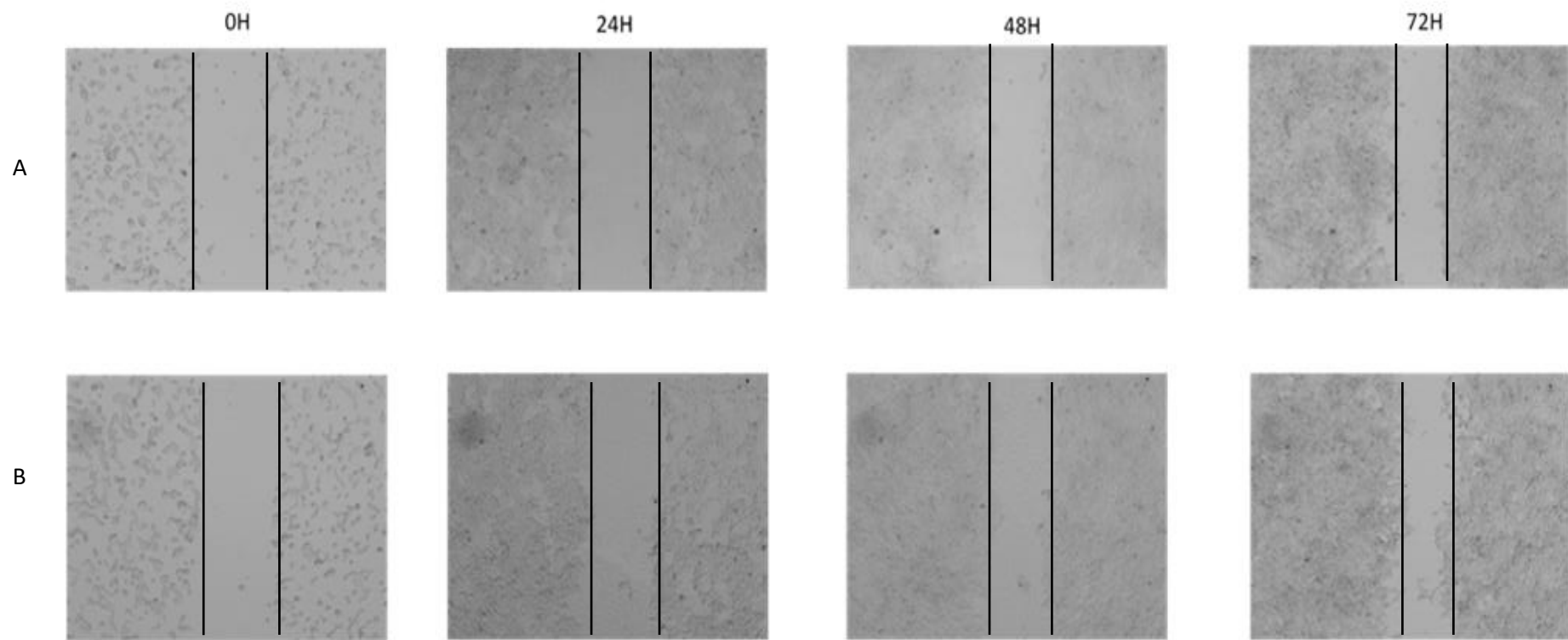


Figura 20. Monitoreo de migración celular en línea celular no tumoral HEK293. Las imágenes se llevaron a cabo a diferentes tiempos, 0H; 24H; 48H y 72H. Usando campo claro y con una magnificación de 4X. Las imágenes muestran a la línea celular HEK293 tratada con A) 0  $\mu\text{M}$  (Control Vehículo); B) 6.5  $\mu\text{M}$  de ferrocenilselenoamida.

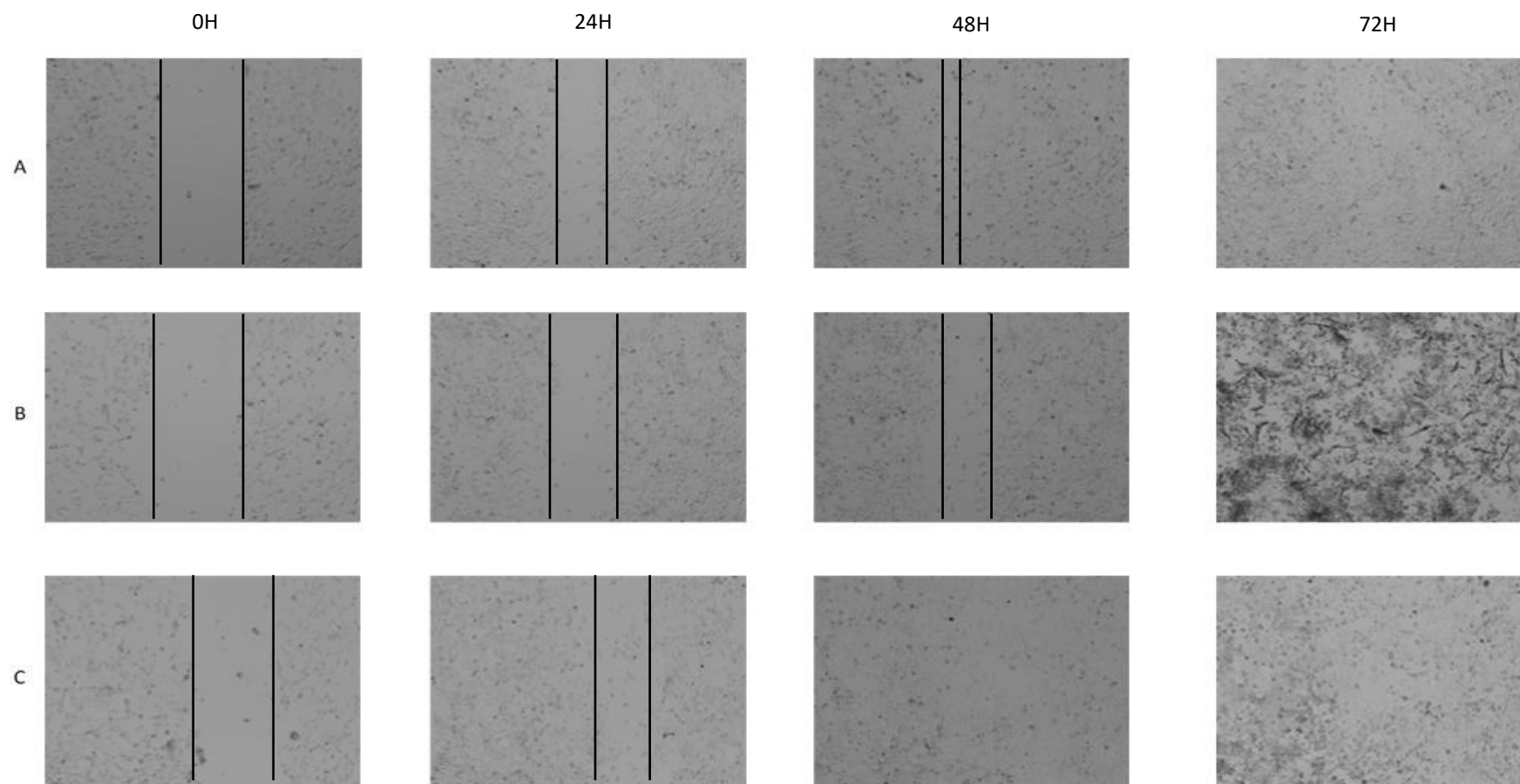


Figura 21. Monitoreo de migración celular en línea celular tumoral U251. Las imágenes se llevaron a cabo a diferentes tiempos, 0H; 24H; 48H y 72H. Usando campo claro y con una magnificación de 4X. Las imágenes muestran a la línea celular U251 tratada con A) 0  $\mu$ M (Control Medio); B) 6.5  $\mu$ M de ferrocenilselenoamida y C) 100  $\mu$ M de temozolomida.

### 30.3 Proliferación celular en presencia de la ferrocenilselenoamida

En esta técnica se busca evaluar la capacidad proliferativa de cada línea celular bajo distintos tratamientos en tiempos establecidos.

En la línea no tumoral, (FiguraA), se observa que el tratamiento con la molécula organometálica, en las dos diferentes concentraciones experimentales (3.7  $\mu\text{M}$  y 6.5  $\mu\text{M}$ ), no presentaron diferencia significativa con respecto al control vehículo de cada una de ellas, por lo que se sugiere que la actividad proliferativa basal de esta línea celular no se vio comprometida en las condiciones experimentales señaladas.

Por el contrario, para la línea celular tumoral, (FiguraB), en el tratamiento con la ferrocenilselenoamida, desde las 24 horas se presentaron cambios entre los grupos y con las dos diferentes concentraciones de la molécula organometálica (3.7  $\mu\text{M}$  y 6.5  $\mu\text{M}$ ). A las 48 y 72 h se mostró un mayor efecto, alcanzando únicamente un porcentaje aproximado de proliferación del 50 y 60%, respectivamente.

Todos los resultados anteriores muestran que la molécula organometálica a base de hierro tiene un efecto inhibitorio tanto en la capacidad proliferativa y migratoria de la línea tumoral U251, pero no en las células no tumorales.

Por tanto, a continuación, se decidió analizar los cambios en el metabolismo y señalización producidos por el tratamiento con la ferrocenilselenoamida en estas células de glioblastoma.

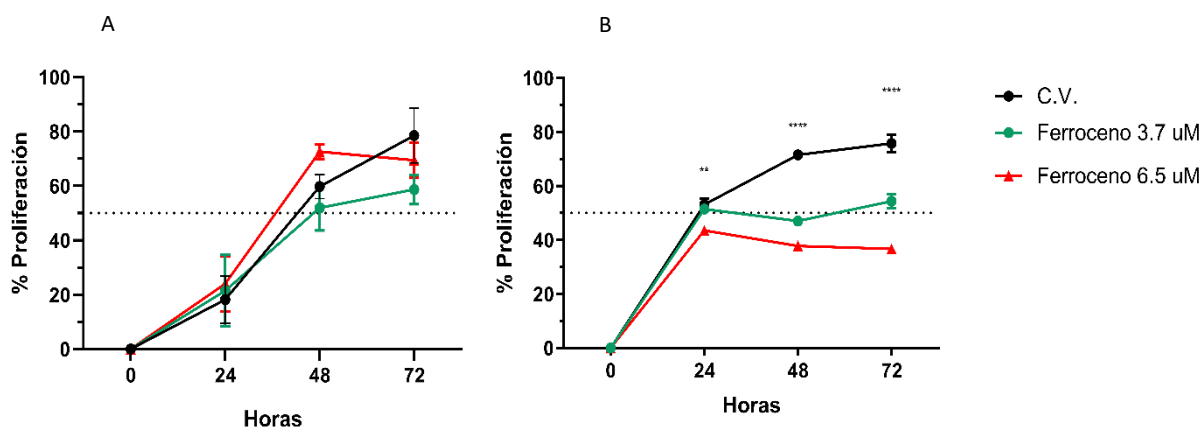


Figura 22. Cuantificación de la proliferación celular en línea no tumoral HEK293 (A) y tumoral U251(B). Porcentaje de proliferación celular a diferentes tiempos,  $n=4$ ,  $**p=0.0093$ ,  $****p<0.0001$ .

### 30.4 Participación de la ferrocenilselenoamida en el metabolismo celular

Para evaluar si el compuesto organometálico a base de hierro es capaz de generar cambios en el metabolismo en ambas líneas celulares, se llevó a cabo el estudio metabolómico tanto del medio extracelular como del intracelular. Los espectros de RMN de cada línea y de cada condición se muestran en la Figura 23-26. El análisis de los espectros fue llevado a cabo en el recurso electrónico Metaboanalyst. Esta plataforma generó dos análisis estadísticos, el de componentes principales (PCA) y el discriminante de mínimos cuadrados parciales (PLS DA), ver Figura y Figura .

De manera general, cada punto en las gráficas representa un grupo de células diferente. En el medio extracelular, (Figura A), correspondiente a las células no tumorales, tanto el control medio como el tratamiento con la ferrocenilselenoamida a 24 h, están dentro del mismo clúster, lo que significa que el perfil metabólico es similar entre ellos, pero existen diferencias, marcadas principalmente por el componente principal 1, PC1, (eje X). Para el tratamiento con la ferrocenilselenoamida a 72 h y el control vehículo a las 24 h, sucede algo similar, los clústeres se sobreponen, (perfil metabólico similar) pero la diferencia radicará en el componente principal 2, PC2, (eje Y).

En el medio intracelular, (Figura B), se sobreponen las señales en las células con el tratamiento con la organomolécula a base de hierro 24h y control vehículo a 24 h cuya mayor diferencia se debe al PC2. En el tratamiento de 72 h con la ferrocenilselenoamida, ya existe diferencia con los otros dos grupos tanto en PC2 como en PC1, señalando menor similitud entre ellas. En la Figura C y Figura D (análisis de PLS DA), sucede algo parecido, los clústeres no marcan una diferencia. Esto sugiere que, a 72 h con el tratamiento de la molécula organometálica, si existe un cambio en el perfil metabólico en la línea no tumoral HEK293 encontrado mediante al análisis de la variación de los componentes.

En la línea tumoral U251, (Figura A y Figura B), se observa en el medio extracelular que los tres clústeres a 24 h, temozolomida, ferrocenilselenoamida y control vehículo no se sobreponen sugiriendo que no hay tanta similitud entre sus perfiles metabólicos. Además, los clústeres de la ferrocenilselenoamida y el control vehículo, son menos amplios en PC1 que en el PC2 lo que indica que la variación de metabolitos se genera en PC2 y para temozolomida, la variación en su perfil se observa en el PC1. En el medio intracelular, existe la separación de los clústeres para control vehículo y ferrocenilselenoamida a 24 h. En el clúster de temozolomida, a pesar de que se sobrepongan con los resultados de la molécula a base de hierro, las diferencias entre ellos radicarán en PC2. En el análisis de PLSDA, Figura C y Figura D, existe un comportamiento similar al PCA, lo que sugiere que a partir de 24 horas existe un cambio en el perfil metabólico de la línea celular tumoral, tanto en la ferrocenilselenoamida 24 h como temozolomida a 24h

Para la identificación de estos componentes principales (PC1 y PC2), y así poder saber que metabolitos eran los que mayor diferencia marcaban en los perfiles metabólicos, se planeaba un análisis cuantitativo de los diferentes espectros obtenidos de cada muestra, pero desafortunadamente no se logró llegar hasta esos resultados, por lo que se decidió tomar la decisión de evaluar metabolitos claves en las neoplasias como lo son lactato, glutamina y glutamato.



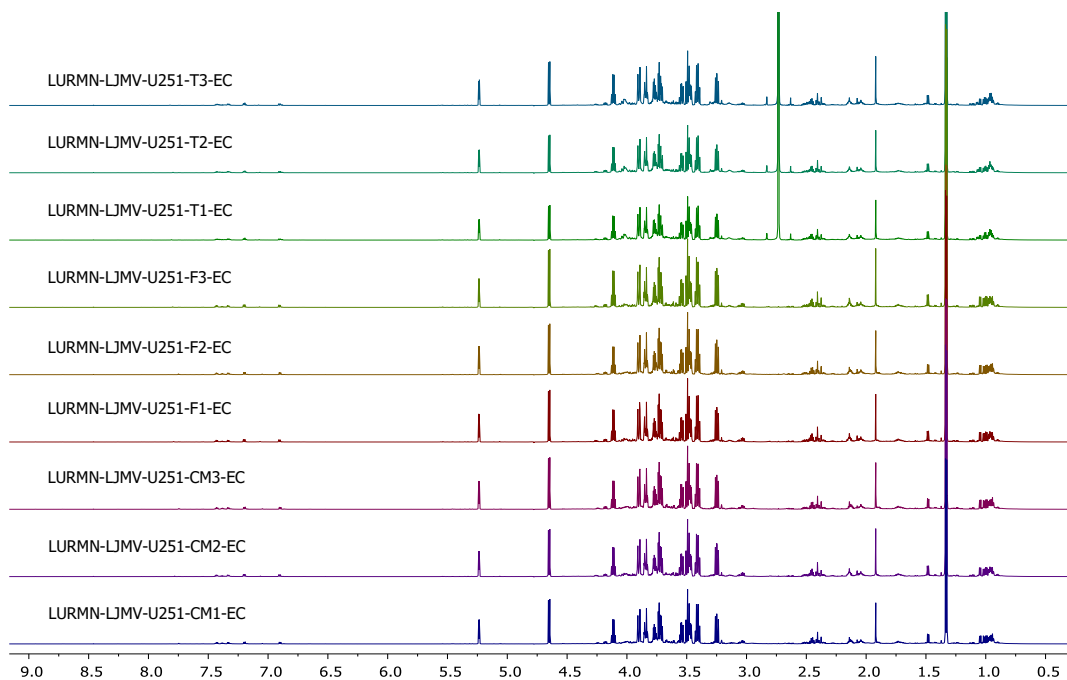


Figura 23. Espectros de RMN realizados a U251 en un Bruker AVIII 700MHz. Sobre cada espectro del lado superior izquierdo se encuentra la identificación de cada uno de ellos, siendo EC extracelular, CM: control medio, F: ferrocenilselenoamida, T: temozolomida. Realizados por triplicado y solamente por 24 horas.

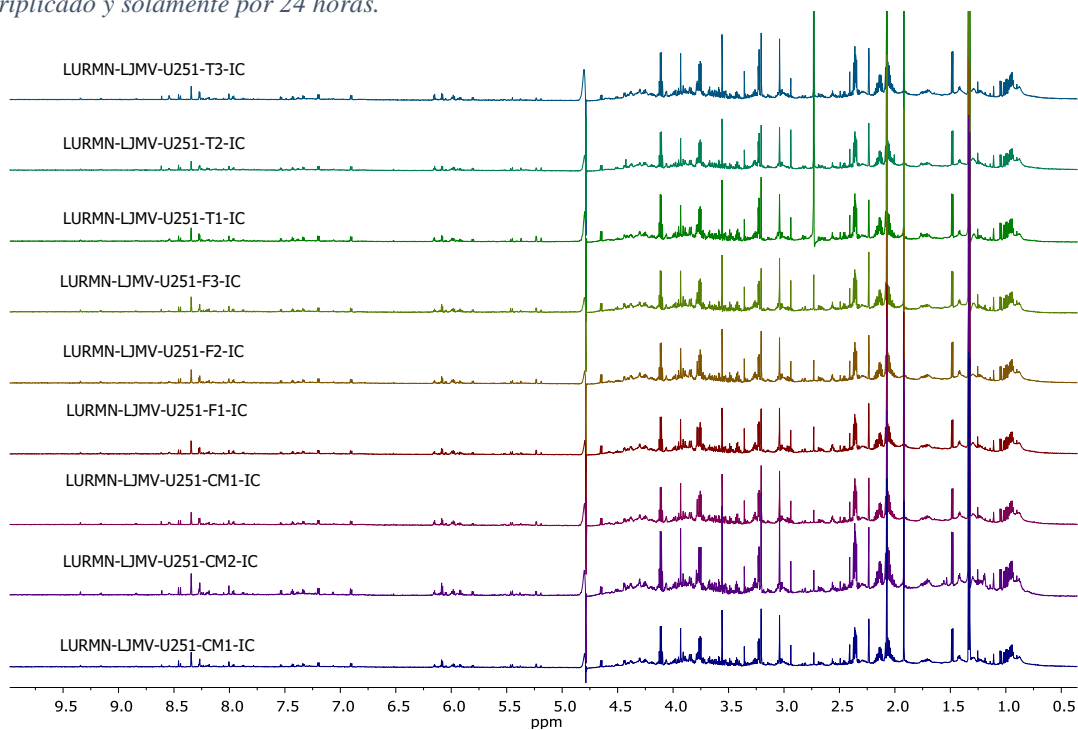


Figura 24. Espectros de RMN realizados a U251 en un Bruker AVIII 700MHz. Sobre cada espectro del lado superior izquierdo se encuentra la identificación de cada uno de ellos, siendo IC Intracelular, CM: control medio, F: ferrocenilselenoamida, T: temozolomida. Realizados por triplicado y solamente por 24 horas.

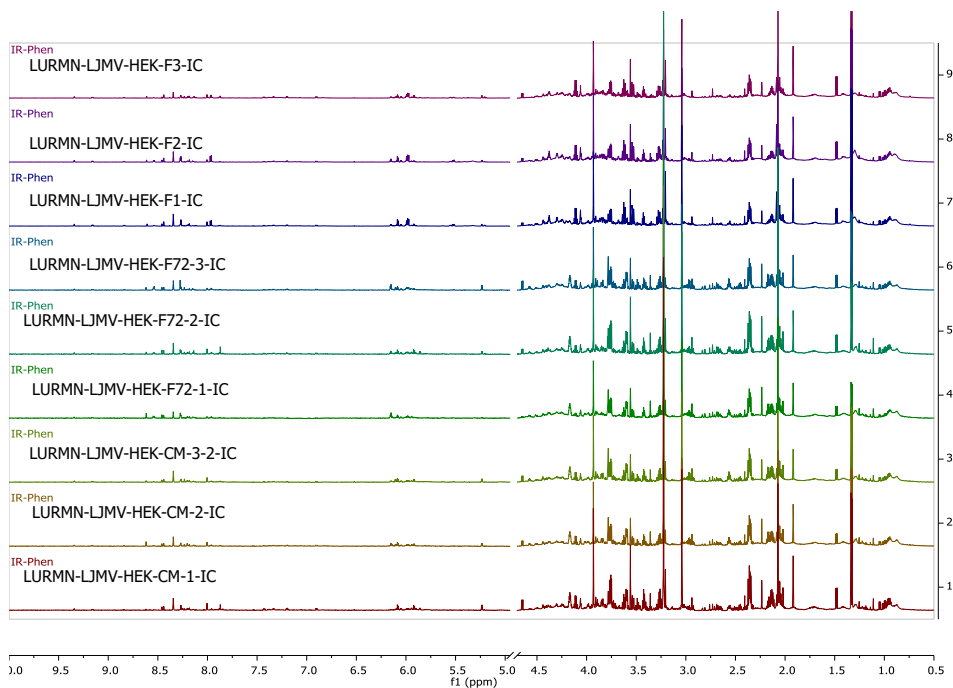


Figura 25. Espectros de RMN realizados a HEK293 en un Brucker AVIII 700MHz. Sobre cada espectro del lado superior izquierdo se encuentra la identificación de cada uno de ellos, siendo IC Intracelular, CM: control medio, F: ferrocenilselenoamida, T: temozolomida. 72 horas. Realizados por

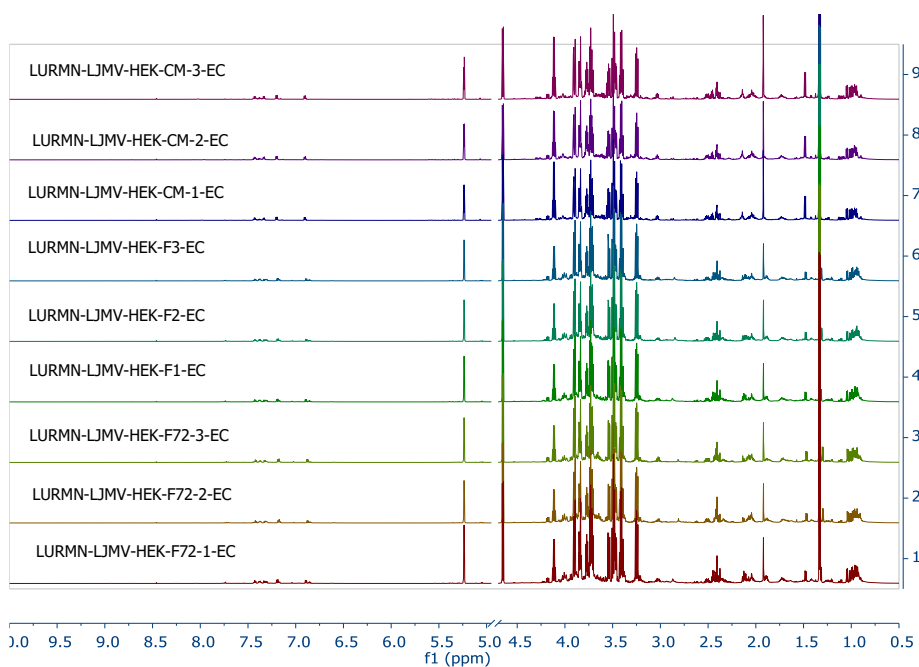


Figura 26. Espectros de RMN realizados a HEK293 en un Brucker AVIII 700MHz. Sobre cada espectro del lado superior izquierdo se encuentra la identificación de cada uno de ellos, siendo EC Extracelular, CM: control medio, F: ferrocenilselenoamida, T: temozolomida. 72 setenta y dos horas. Realizados por triplicado.

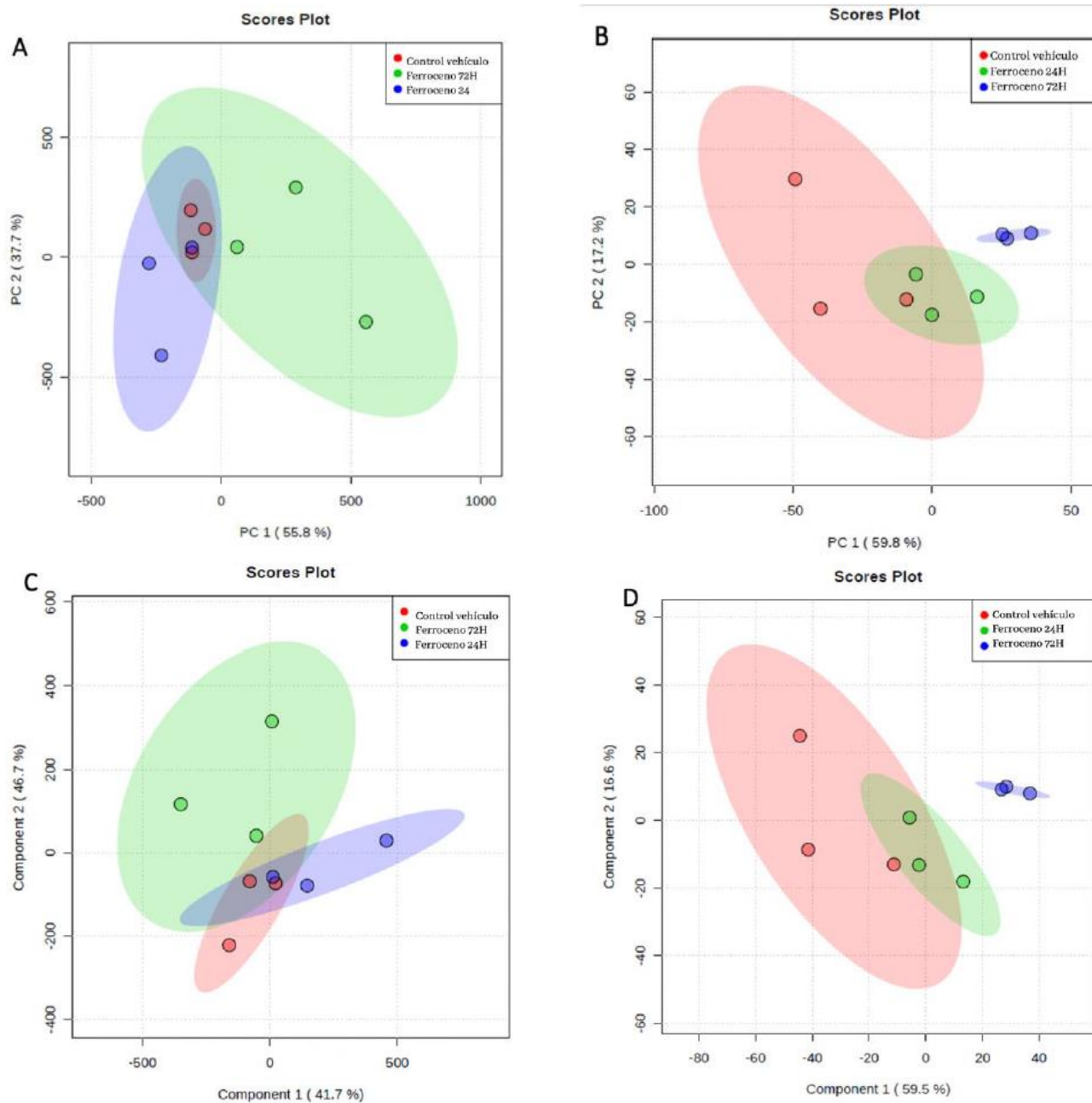


Figura 27. Análisis de espectros de HEK293 por RMN en Metaboanalyst. (A) y (B) Análisis de Componentes principales (PCA) para medio extracelular e intracelular respectivamente. (C) y (D) Análisis Discriminante Mínimos Cuadrados Parciales (PLS DA) para medio extracelular e intracelular respectivamente. (72) setenta y dos horas.

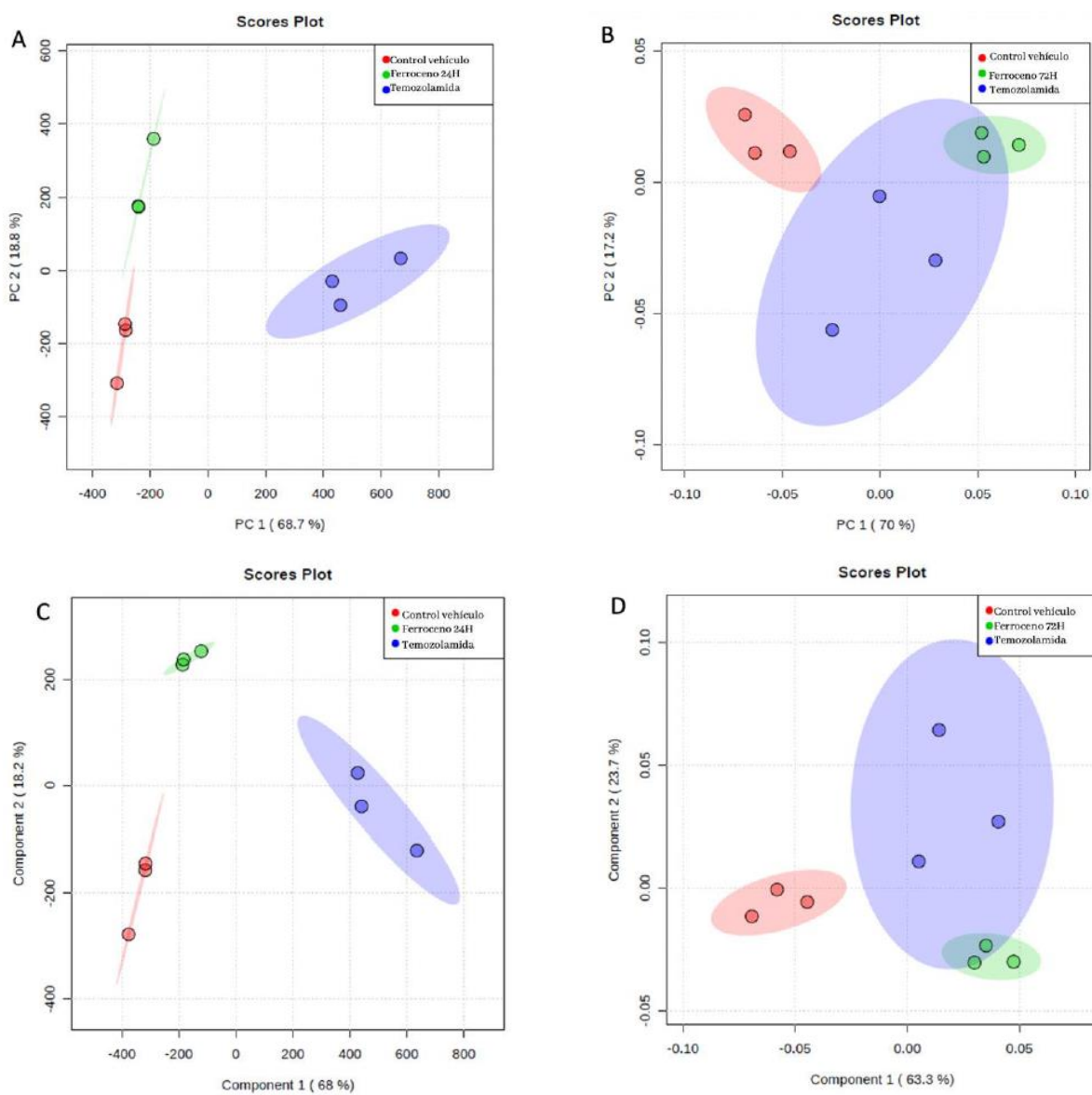


Figura 28. Análisis de espectros de U251 por RMN en Metaboanalyst. (A) y (B) Análisis de Componentes principales (PCA) para medio extracelular a 24 horas e intracelular a 72 horas respectivamente. (C) y (D) Análisis Discriminante Mínimos Cuadrados Parciales (PLS DA) para medio extracelular a 24 horas e intracelular a 72 horas respectivamente.

### 30.5 Diferencia en la producción de lactato en presencia del compuesto organometálico

El glioblastoma, es uno de los tumores que muestran cambios importantes en el metabolismo celular, especialmente aquellos relacionados con la producción de lactato como glutamato. Con base en los resultados preliminares encontrados por medio de los estudios de metabolómica, donde encontramos diferencias entre el metabolismo de las células sanas y tumorales en presencia de la ferrocenilselenoamida y teniendo conocimiento de la participación del metabolismo de en tumores de cerebro, decidimos cuantificar tres metabolitos clave en este tipo de neoplasia.

Para la determinación de lactato extracelular, (Figura 29), se utilizó una modificación del método empleado por R.B. Brand de 1982, el cual detecta espectrofotométricamente el NADH producido por la reacción catalizada por la D-LDH. En la línea celular no tumoral HEK293, bajo los tratamientos efectuados y los tiempos de exposición establecidos, no se observaron cambios significativos en los niveles de lactato extracelular. En cambio, para la línea celular tumoral U251, el tratamiento de la ferrocenilselenoamida, con su  $IC_{50}$ ,  $IC_{25}$  e  $IC_{12.5}$  desde las 24 h mostraron una disminución significativa con respecto al control vehículo en la exportación de lactato al medio extracelular. De igual manera con el tratamiento terapéutico de temozolomida, la exportación de lactato decae desde las 24 h de exposición. Para las 72 h, estas diferencias estadísticas aumentan para cada tratamiento, pero el ejercido con la  $IC_{50}$  del organometal es el que más evidencia esta disparidad, pues con un valor  $p$  menor a 0.0001 señala una disminución mayor en la exportación de lactato con respecto al control. De hecho, la concentración de lactato en presencia de la ferrocenilselenoamida es mucho menor siendo esta de aproximadamente 600  $\mu$ M que comparada con la con temozolomida que es de más de 900  $\mu$ M a 72hr.

Estos resultados también muestran que la molécula organometálica fue capaz de reducir la exportación del lactato afectando así la supervivencia de la línea tumoral de glioblastoma, aun con el tratamiento en dosis menores a 1  $\mu\text{M}$  ( $\text{IC}_{12.5}$ ) obteniendo concentraciones por debajo de las alcanzadas por la temozolomida a una concentración de 100  $\mu\text{M}$ .

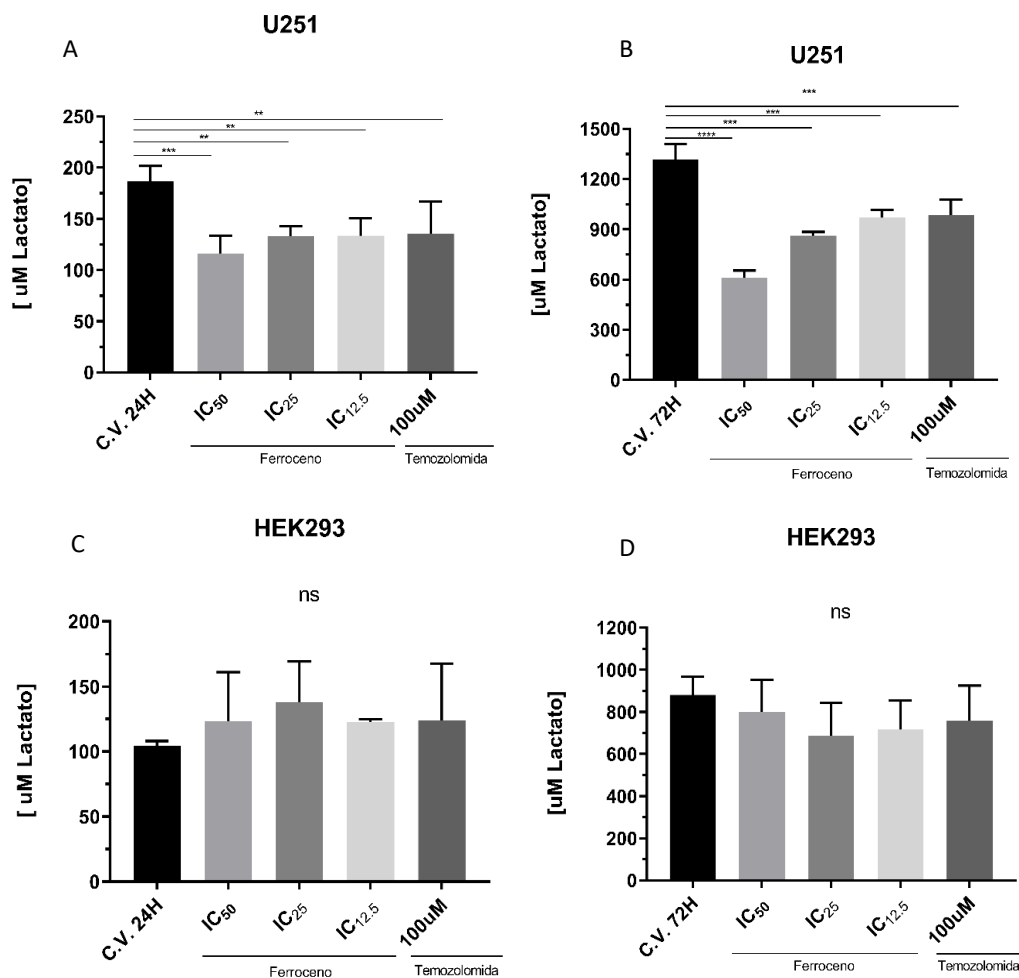


Figura 29 Determinación de niveles de lactato extracelular en línea celular tumoral U251 (a y b) y línea celular no tumoral HEK293 (c y d). A y C) Exposición de 24 horas; tratamientos 0  $\mu\text{M}$  (Control Medio);  $\text{IC}_{50}$  de 6.5  $\mu\text{M}$ ;  $\text{IC}_{25}$  de 3.12  $\mu\text{M}$  e  $\text{IC}_{12.5}$  de 1.56  $\mu\text{M}$  de ferrocenilselenoamida y 100  $\mu\text{M}$  de temozolomida. B y D) Exposición de 72 horas; tratamientos 0  $\mu\text{M}$  (Control Medio);  $\text{IC}_{50}$  de 3.7  $\mu\text{M}$ ;  $\text{IC}_{25}$  de 1.85  $\mu\text{M}$  e  $\text{IC}_{12.5}$  de 0.93  $\mu\text{M}$  de ferrocenilselenoamida y 100  $\mu\text{M}$  de temozolomida.  $N=4$ , ns= sin significancia estadística  $**p<0.002$ ,  $***p<0.001$ ,  $****p<0.0001$ .

### 30.6 Cambios en la concentración de glutamina y glutamato extracelular

La determinación de glutamina y glutamato se llevó a cabo con el kit Glutamine/Glutamate-Glo Assay, que mide la luminiscencia generada por la luciferasa y está acoplada a varias reacciones empezando por la conversión de glutamina a glutamato. Con este kit se midió la cantidad de metabolitos que se encontraban en el medio extracelular bajo el tratamiento del organometal ( $IC_{50}$ ) y con el vehículo a dos diferentes tiempos de exposición.

Con respecto a la cuantificación de glutamato a 24 h, en la línea celular tumoral U251 bajo el tratamiento con la ferrocenilselenoamida, se encontró un aumento en los niveles de glutamato extracelular, pero este no llegó a niveles significativos entre los grupos de estudio. Caso contrario sucedió a las 72 h, pues sí se observó un aumento significativo con un valor cercano a  $80 \mu M$  de glutamato extracelular al utilizar la molécula organometálica, donde el control vehículo resultó tener una concentración de aproximadamente  $50 \mu M$ .

Con respecto a la glutamina, desde las 24 h de tratamiento, existe diferencia significativa entre los grupos. El medio extracelular de la línea U251, bajo tratamiento con la molécula organometálica, presentó concentraciones mayores a las encontradas en el medio de las células sin ningún tipo de tratamiento, siendo de  $2700 \mu M$  y  $1700 \mu M$  respectivamente. Este comportamiento se incrementó a las 72 h, pues las concentraciones de glutamina disminuyeron hasta niveles aproximados de  $1000 \mu M$  en el medio extracelular del control vehículo; dando un indicio de que el importe de glutamina se alteró, pues el medio de las células tratadas con la organomolécula presentó una concentración de  $2600 \mu M$ , un valor aproximado al que se obtuvo a las 24 h.

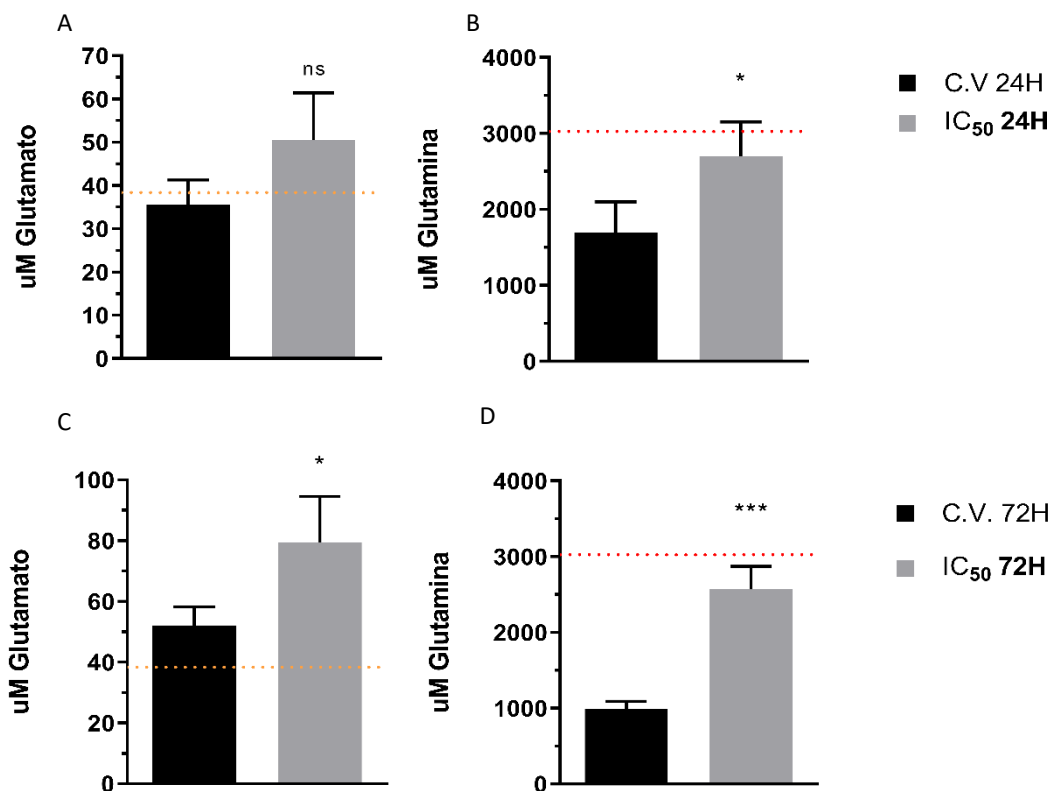


Figura 30. Cuantificación de niveles de glutamato (a y c) y glutamina (b y d) extracelular en la línea celular tumoral U251. Tiempos de exposición 24 horas (imágenes superiores) y 72 horas (imágenes inferiores). Tratamiento efectuado: IC<sub>50</sub> =6.5 μM de ferrocenilselenoamida, C. V.: control vehículo y en líneas punteadas rojas está señalado los niveles basales tanto de glutamato como de glutamina del medio RPMI 1640. N=4, ns= sin significancia estadística \*p=0.01, \*\*\*p<0.001.

### 30.7 Contribución de las especies reactivas de oxígeno en la citotoxicidad.

#### 30.7.1 Medición de peróxido de hidrógeno

Uno de los mecanismos de muerte celular está relacionado a la producción de ROS tanto en células sanas como tumorales. Por tal motivo decidimos cuantificar los niveles de algunas de ellas en presencia o ausencia del compuesto organometálico tanto en células sanas como cancerosas.

Primero se cuantificó la cantidad de peróxido de hidrógeno a través del ensayo de Amplex® Red que detecta específicamente la [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>] liberado de las líneas celulares. Este ensayo, utiliza el reactivo 10-acetil-3,7-dihidroxifenoxacina, el cual, en presencia de la peroxidasa, el reactivo Amplex® Red reacciona con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en una estequiometría 1:1 para crear un producto de oxidación rojo fluorescente, la resorufina.



En la línea celular no tumoral, HEK293, bajo las condiciones dadas de trabajo, no presentó diferencias significativas del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generado bajo el tratamiento con la ferrocenilselenoamida a ninguno de los tiempos establecidos, (Figura 31A) En cambio, la línea celular tumoral, U251, (Figura 31B), a partir de las 24h con el tratamiento de ferrocenilselenoamida, presenta una disminución en la cantidad de peróxido de hidrógeno de un 10% mostrando diferencias significativas comparadas contra el control vehículo; este fenómeno es similar a 48h, pero esta diferencia se acentúa hasta llegar a niveles aproximados de un 50%. Sin embargo, a 72h se manifiesta una mayor diferencia en la producción de esta especie reactiva de oxígeno de más de un 50% comparada con su control vehículo. Sugiriendo que efectivamente las células dejaron de producir H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> puesto que comenzaron a morir debido al tratamiento con la ferrocenilselenoamida. La disminución en la producción de peróxido de hidrógeno está normalizada con respecto al número de células, lo que nos indica que la concentración encontrada fuera de la célula está asociada a su viabilidad, es decir que, al haber menor cantidad de células, la concentración de peróxido es menor, complementando así los resultados tanto de proliferación, migración y viabilidad.

Cabe señalar que a pesar de que la organomolécula fue capaz de reducir la cantidad de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> producido por la línea celular U251, con niveles máximos de 1000 µM, estos valores nunca alcanzaron los niveles que presenta la línea celular no tumoral, donde su valor más alto fue de 300 µM aproximadamente.

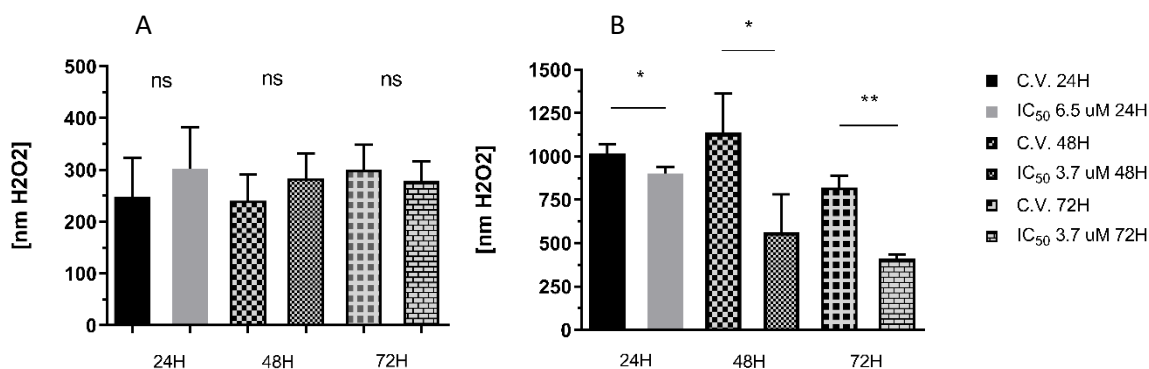


Figura 31. Medición de [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>]. A) Línea celular no tumoral HEK293; B) Línea celular tumoral U251. n=4; \*p<0.1, \*\*p<0.01.

### 30.7.2 Determinación del anión superóxido

Otra ROS encontrada de manera natural en las células, es el anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ). Esta ROS fue cuantificada en células de glioblastoma a partir del tratamiento con ferrocenilselenoamida utilizando el reactivo rojo MitoSOX™. Este reactivo penetra a la mitocondria de células vivas y su oxidación se lleva a cabo por superóxidos y no por otros sistemas de generación de especies reactivas de oxígeno.

En la línea celular U251, bajo las condiciones de trabajo dadas, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en la producción de  $O_2^{\cdot-}$  con los tratamientos utilizados ni en los dos tiempos establecidos para el experimento, (Figura 32).

Además, se puede observar que los valores basales de  $O_2^{\cdot-}$  rondan diferentes niveles a las 24 y 72 h, sugiriendo que hay un ligero aumento en su producción, aunque no se presentaron diferencias entre el tratamiento por elección, la temozolomida, y la molécula de estudio.

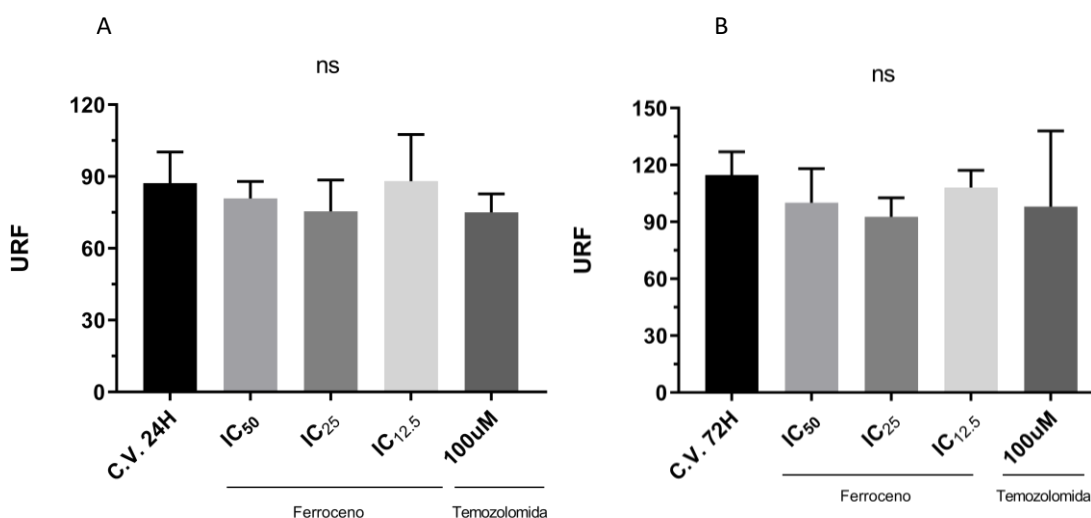


Figura 32. Determinación de anión superóxido. Para ambos casos fueron utilizadas células de glioblastoma multiforme U251. Comparación a diferentes tiempos de exposición. A) 24 horas; tratamientos 0  $\mu$ M (Control Vehículo); IC50 de 6.5  $\mu$ M; IC25 de 3.12  $\mu$ M e IC12.5 de 1.56  $\mu$ M de ferrocenilselenoamida y 100  $\mu$ M de Temozolomida. B) 72 horas; tratamientos 0  $\mu$ M (Control Vehículo); IC50 de 3.7  $\mu$ M; IC25 de 1.85  $\mu$ M e IC12.5 de 0.93  $\mu$ M de ferrocenilselenoamida y 100  $\mu$ M de temozolomida. N=4, ns=sin diferencias estadísticas entre grupos de estudio, URF: unidades relativas de fluorescencia

### 30.8 La molécula de ferrocenilselenoamida reduce la expresión de marcadores proliferativos y muestra inducción de apoptosis.

Finalmente se decidió analizar el efecto de la ferrocenilselenoamida sobre vías de señalización encargadas de procesos tales como la proliferación y muerte celular. Primero se evaluó la actividad de la  $\beta$ -catenina la cual actúa como segundo mensajero dentro de la vía Wnt, dicha vía está sobre expresada en varios tipos de cánceres ya que tiene un papel clave en la tumorigénesis y en la adhesión célula-célula (Jung & Park, 2020b). Se encontró que esta proteína, bajo el tratamiento con la ferrocenilselenoamida disminuye notablemente su expresión en las células. Aparentemente existe una mayor diferencia estadística con el tratamiento terapéutico de temozolomida, sin embargo la concentración utilizada de esta es al menos 15 veces mayor que la molécula organometálica.

Para sugerir algún mecanismo por el cual podría llevarse a cabo la muerte celular, se midió la expresión de Bcl-2, la cual es una proteína involucrada en la prevención de la inducción apoptótica. De igual manera en la Figura , se observó una importante disminución de la expresión de la proteína Bcl-2 en las células tratadas tanto con la temozolomida como con la molécula organometálica. Aunado a esto, se analizó también la actividad de la caspasa-3, proteína donde convergen ambas vías apoptóticas, brindándonos información acerca del posible mecanismo de muerte celular efectuado por la molécula inorgánica. En ambos casos, para temozolomida y ferrocenilselenoamida, la cantidad de caspasa 3 cuantificada aumentó, lo que concuerda con un efecto apoptótico tras la exposición de 24 h.(Carrington et al., 2017; J. Li & Yuan, 2008)

Para hacer una evaluación complementaria a la citotoxicidad, se estudiaron a las proteínas PTEN y p-ERK. La primera es una enzima que cataliza la hidrólisis del Fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP<sub>3</sub>), para formar Fosfatidilinositol-(4,5)-difosfato (PIP<sub>2</sub>) y fosfato inorgánico. Esta enzima es pieza clave en la regulación de la vía PI3K-AKT. La segunda proteína, p-ERK, forma parte de la vía de MAPK, involucrada en la activación de factores de transcripción importantes para el crecimiento celular, la proliferación y la supervivencia.

Los resultados muestran decremento significativo en los niveles de p-ERK comparado con el control, y sucede lo mismo con la temozolomida, pero mostrando una diferencia menor. En la línea celular utilizada, U251, PTEN se encuentra mutada, por lo que su actividad normal es disfuncional haciendo que la célula prolifere sin control, y a pesar de que los niveles bajo tratamiento con la molécula organometálica la disminuyen, este efecto no sugiere un aumento en la proliferación, sino que la disminución en su nivel de expresión se puede asociar con la muerte celular que efectúa la molécula organometálica.

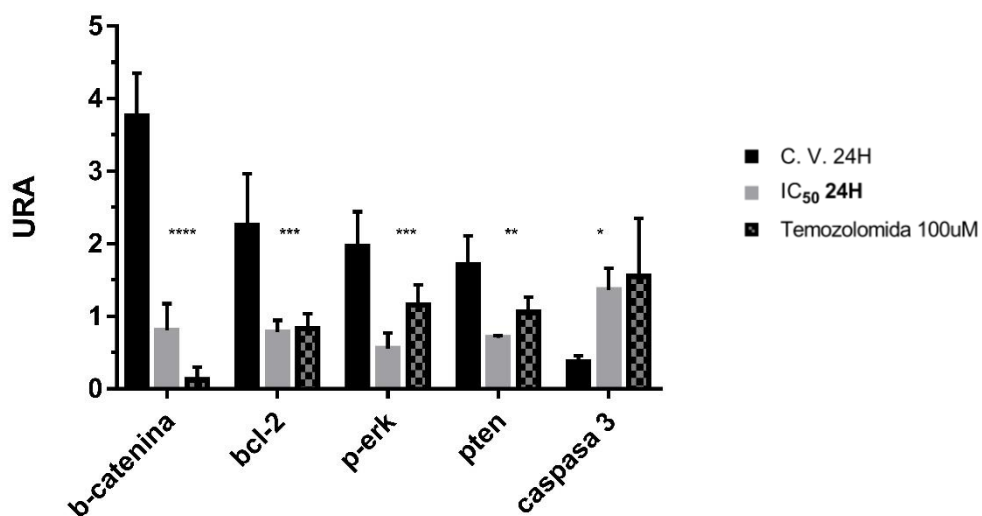


Figura 33. Cuantificación en la expresión de proteínas Exposición de 24 horas; tratamientos 0  $\mu\text{M}$  (Control Vehículo), IC<sub>50</sub> de 6.5  $\mu\text{M}$  y 100  $\mu\text{M}$  de temozolomida. N=3, ns= sin significancia estadística. \* $p=0.01$ , \*\*\* $p<0.001$ , \*\*\*\* $p<0.0001$ . Las proteínas totales fueron extraídas y los westernblots fueron llevados a cabo usando los anticuerpos indicados. URA: Unidades Relativas de Área

## 31 Discusión

El glioblastoma o astrocitoma grado IV, es el tipo más común y letal de tumores cerebrales primarios malignos, el cual se forma a partir de tejido glial afectando principalmente a adultos. Los pacientes que presentan esta neoplasia tienen una esperanza de vida promedio de 15 meses pues los síntomas suelen llegar en etapas tardías y esto genera que el diagnóstico no sea favorable. Además de la ineficiencia de los agentes antitumorales existentes, en años recientes se han encontrado distintas variantes y subclasificaciones en el glioblastoma que hacen aún más complicado su tratamiento al no poder dirigir estas terapias.

Comprender como es el perfil metabólico, los grados de expresión de las proteínas clave en vías de señalización, los niveles de expresión de ROS en los glioblastomas, entre otros factores, sería trascendental para abrir un nuevo panorama en el tratamiento de este tipo de neoplasias. (Holland, 2000; Louis et al., 2016)

En este trabajo, se intenta dilucidar el efecto de moléculas a base de hierro y selenio, sobre la línea celular U251 a nivel metabólico, expresión de proteínas, viabilidad, y varias funciones importantes para la supervivencia de este tipo de cáncer cerebral para presentar un precedente para futuras investigaciones.

Después del tamizaje de 6 diferentes líneas celulares, se decidió optar por aquella donde la  $IC_{50}$  estuviese en el rango micromolar más bajo, además de tener efecto tanto a las 24 como a las 72 h de estudio.

Con lo anterior, se decidió optar por la línea celular U251y posteriormente se comparó con el tratamiento por elección en líneas de glioblastoma, la temozolomida, utilizando una concentración de 100  $\mu$ M ya que en estudios *in vitro* suelen usarse un rango de concentraciones entre 100 a 2000  $\mu$ M (Borhani et al., 2017; Ni et al., 2019)

La molécula con rutenio resultó eficaz contra líneas cancerosas de pulmón y útero, sin embargo, no tuvo impacto sobre la viabilidad a los dos tiempos establecidos. Estos resultados se deberán analizar posteriormente, para encontrar la interacción específica con su blanco molecular.

La única molécula capaz de reunir los requisitos mencionados anteriormente fue la ferrocenilselenoamida en contra de la línea celular de glioblastoma humano U251. Por tanto, se sugiere que el tratamiento con la molécula a base de hierro es específico contra este tipo de línea de

cáncer cerebral ya que tuvo efecto nulo contra la línea de glioblastoma LN229 y contra la de neuroblastoma Neuro-2a.

Es posible que esta molécula haya afectado únicamente la viabilidad de una de las dos líneas de glioblastoma debido a su procedencia, ya que la línea U251 proviene de un hombre de 75 años y la línea LN229 de una mujer de 60 años. Por tanto, los niveles de expresión de ciertas proteínas son diferentes, como en el caso de PTEN, TP53, CDKN2A entre otras. Posiblemente las subclasificaciones sean la causa de la diferencia en la respuesta de la molécula organometálica. (Cellosaurus, 2021).

Con respecto a la capacidad migratoria de esta línea celular, observamos que a las 24 h de tratamiento existe una disminución significativa solamente con la molécula de ferrocenilselenoamida, mientras que con el tratamiento control, este fenómeno no generó diferencia alguna. Esto sucede de igual manera a las 48 h y es hasta las 72 h cuando se evidencia aún más esta diferencia. A este tiempo, las células se desprenden por completo de la placa, con lo cual podría ser una señal de muerte celular por apoptosis, ya que se sabe que una de las características que suelen presentarse bajo este mecanismo es la pérdida de adhesión célula-célula. (Liu et al., 2018).

Este efecto anti-migratorio generado por la molécula a base de hierro es de sumo interés ya que logra evitar la migración de esta línea celular, la cual tiene como una de sus características principales la capacidad de hacer metástasis hacia tejido circundante. (Suzanne & Steller, 2009).

Con respecto a la línea celular HEK293, solo se encontraron diferencias estadísticas a las 72 h de tratamiento con la organomolécula, pero comparando su nivel de proliferación con la línea tumoral, este no llega a alcanzar sus niveles basales puesto que, a este tiempo, la línea tumoral ha alcanzado a cerrar la herida en su totalidad. Si bien esta línea celular no es de linaje cerebral, sirve como una buena comparación para este procedimiento ya que la migración es un proceso fundamental en células embrionarias y puede ser comparable con el proceso de metástasis en la transición EMT. (Scarpa & Mayor, 2016).

Finalmente, dentro de esta característica o *hallmark* existen varias vías involucradas que posiblemente se vean afectadas. Tal es el caso de la vía PI3K/AKT y la vía MAPK, entre otras, que también tienen efecto sobre vías de proliferación y supervivencia pues existe una estrecha relación entre la proliferación y la migración en células de glioblastoma, pues hay evidencia que estos dos procesos comparten vías de señalización comunes lo cual sugiere que existe un mecanismo que controle ambos procesos (Hatzikirou et al., 2010; Taylor et al., 2015)

El proceso de proliferación celular ocurre de manera natural en la mayoría de células de nuestro organismo, pero en células no tumorales, es un proceso altamente regulado (proteína Rb, CDKs, etc. Feitelson et al., 2016). En cambio, en células tumorales como es el caso de la línea celular U251, este proceso se mantiene desregulado lo cual altera por completo la progresión tumoral. Este proceso proliferativo incontrolado, es otro de los *hallmark* identificados por Hanahan & Weinberg y que en está presente en estas neoplasias. Además, en conjunto con la migración juegan un papel importante en la progresión tumoral. (Hanahan & Weinberg, 2011).

Es importante señalar que las células de glioblastoma rara vez hacen metástasis fuera del neuroeje, en su lugar, la invasión tumoral y la proliferación es la principal causa de muerte por este tipo de cáncer. Por lo que, el hecho de que la ferrocenilselenoamida ejerza esta característica tanto antiproliferativa como anti-migratoria y que comparada con la temozolomida a una concentración al menos 15 veces menor, logra posicionar a esta molécula en un sitio importante para futuras investigaciones. (Xie et al., 2014).

Todos estos efectos en la viabilidad, proliferación y migración generados por la molécula organometálica a base de hierro se le añade además los cambios metabólicos en las líneas celulares utilizadas, pues la reprogramación metabólica es un sello distintivo en el cáncer y en especial de este tipo de neoplasias donde las diferencias son más evidentes.

Los estudios preliminares de metabolómica generados a través de RMN, indicaron que hay discrepancias en el metabolismo. En el caso del análisis supervisado y el no supervisado, tanto en el medio intracelular como en el extracelular, las diferencias no están tan marcadas ya que se superponen entre sí en la mayoría de los casos salvo por el tratamiento en el medio intracelular el cual si presenta cambios en el comportamiento metabólico.

Por otro lado, el hecho de que estos clústeres celulares se encuentren más distanciados entre sí hace referencia a una mayor diferencia en los metabolitos encontrados tanto en el medio extracelular como el intracelular. Los resultados con la organomolécula a base de hierro señalan que existe un mayor cambio metabólico en el medio intracelular que en el extracelular comparando con el control vehículo. Sin embargo, estos resultados no indican que tipo de metabolitos hay en esas diferencias ya que este análisis se vio truncado y no se pudo identificar el PC1, y el, PC2. Cabe señalar que estos estudios disminuyen las variables de los resultados obtenidos por RMN, y lo hacen al reducir esta multi-variabilidad en un plano de 2 dimensiones o 2 componentes que son los que marcan la mayor diferencia en los metabolitos encontrados. Pero como se mencionó anteriormente, este análisis no

pudo culminarse por lo que se decidió analizar metabolitos clave para este tipo de tumor como lo son el lactato, glutamina y glutamato. (Noch & Khalili, 2015).

Con respecto al lactato, cabe señalar que el resultado de su producción a través de la vía glucolítica y el uso de la glutamina como aminoácido principal para el sustento de las células tumorales es de suma importancia para un *hallmark* bien establecido en este tipo de tumores como la proliferación sostenida. Por lo cual, la reducción en el exporte de lactato, sugiere una disminución en la tasa de proliferación, así como un efecto negativo en la capacidad de producir nuevas estructuras biológicas, pues una de las finalidades de la generación de lactato en exceso es tener la suficiente cantidad de intermediarios metabólicos para generar nucleótidos, lípidos de membrana, etc. (San-millán & Brooks, 2017).

El efecto sobre el exporte de lactato pudiera deberse a una afectación en el transporte por medio de los MCT, especialmente MCT1 y MCT4, que se encuentran sobre expresados en los glioblastomas. Otra explicación pudiera deberse a que el compuesto modifica el consumo de glucosa, generando así una disminución en la producción y exporte de lactato. (San-millán & Brooks, 2017).

Con respecto a otro metabolito clave, el glutamato, el flujo en las células, especialmente en las del sistema nerviosos central, se debe a dos tipos de transportadores, el transportador 2 de aminoácidos excitatorios (EAAT2) y el sistema Xc. La concentración de glutamato extracelular es crucial para un óptimo desempeño en las actividades celulares, pero en las células cancerosas, este tipo de homeostasis está desregulado. El sistema EAAT2 es el encargado de la importación del glutamato extracelular, en células de glioblastoma, la expresión este sistema se encuentra disminuida causando citotoxicidad por acumulación de glutamato. Esto se debe a que no hay enzimas extracelulares capaces de degradarlo, lo cual favorece el desarrollo tumoral. Por otro lado, el sistema Xc se encarga del exporte intracelular de glutamato, el cual intercambia por cisteína. Estos dos sistemas trabajan en conjunto para regular la concentración de glutamato en las células. (Noch & Khalili, 2015).

El aumento significativo en los niveles de glutamato extracelular a las 72 h de exposición puede deberse a una interferencia en el transporte del glutamato por parte del sistema EAAT2.

Si bien, de manera normal las células de glioblastoma tienden a expresar una deficiencia en estos transportadores, con este tratamiento las células tumorales U251, pareciera no afectar en el exporte del glutamato sino por el contrario, afecta el importe de este. Que, si bien parece perjudicial, el favorecimiento de la excitotoxicidad también nos indica una disminución en el metabolismo del glutamato, generando menor actividad proliferativa, tal y como lo observamos con la cuantificación de glutamina.



Con respecto a la glutamina, esta dejó de importarse desde las 24 h, notándose mayor diferencia a las 72 h, probablemente porque los sistemas de transporte se encuentran afectados. La disminución en la importación de glutamina en este tipo de línea celular resulta desfavorable, ya que su metabolismo es esencial para la supervivencia celular, pues está involucrada en procesos como síntesis de aminoácidos, purinas/pirimidinas, NAD y hexosaminas. El cerebro sintetiza glutamato a partir de glutamina, el cual es utilizado como neurotransmisor. Únicamente los astrocitos, gracias al ciclo de glutamina/glutamato generado por medio de la cooperación neurona-astrocito, tienen esta capacidad, ya que las neuronas son incapaces de sintetizarlo desde la glucosa. Esto revela la importancia de este metabolito en esta línea tumoral. (Scalise et al., 2020).

En nuestro estudio el importe de glutamina en presencia del tratamiento se vio afectado, ya que este se encuentra mediado por los transportadores SLC1, SLC6, SLC7 y SLC38, de los cuales el SLC7A11, el SLC1A5 o ASCT2 está sobrexpresado en la mayoría de los gliomas. Esto puede sugerir que el tratamiento impidió el flujo normal de este aminoácido, interfiriendo en su transporte, o que actuó de manera paralela afectando la supervivencia celular por medio de otro blanco terapéutico y con esto se detuvo la expresión de estos transportadores generando una detención en el flujo de glutamina en las células. (Natarajan & Veneti, 2019).

Con estos cambios y diferencias en la reprogramación metabólica de la línea tumoral, se decidió evaluar el efecto sobre la producción de especies reactivas de oxígeno. Con respecto a la producción de  $H_2O_2$ , se puede observar que la disminución de esta ROS concuerda con el efecto citotóxico de la ferrocenilselenoamida. Posiblemente se interfiere el mecanismo de producción de esta especie ya que puede ser generado a partir del anión superóxido por medio de la enzima SOD o quizá esta disminución se deba a que las células tumorales empiezan a morir y por consiguiente baja la producción de peróxido. (R. Buettner, 2012; Turrens, 2003).

Ahora bien, los resultados obtenidos del radical libre  $O_2^-$ , muestran que la molécula a base de hierro no logra afectar la producción de esta molécula a partir del complejo I en ninguno de los tratamientos y tiempos utilizados. A pesar de la falta de efecto sobre la producción de este radical, observamos la disminución en  $H_2O$ , que pudiera deberse a que la enzima SOD se encuentra afectada. (Turrens, 2003).

Esto podría sugerir que la toxicidad de la molécula organometálica no depende del aumento en la producción del anión superóxido ni que se vea afectada la producción mitocondrial de esta molécula.

Si bien son necesarios más experimentos para poder esclarecer este fenómeno, por ejemplo, medir algún efecto secundario del mantenimiento del  $O_2$  como la lipoperoxidación lipídica o estudiando los

efectos de la SOD en la línea tumoral, podemos decir que la organomolécula está afectando ya sea de manera directa o indirecta a la producción de especies reactivas de oxígeno.

Para poder dar un panorama general de la forma en que esta molécula afecta proteínas clave en la viabilidad, proliferación migración y muerte celular se decidió analizar su nivel de expresión.

Dentro de las proteínas clave, se puede mencionar a la proteína ERK, la cual es una cinasa regulada por señales extracelulares y pertenece a la familia de las MAPK, la cual está involucrada en procesos clave como proliferación, supervivencia, formación tumoral y diferenciación. En la mayoría de los cánceres esta proteína se encuentra mutada y para el caso del glioblastoma esta no es la excepción. En cuanto a PTEN, se sabe que proteína es pieza clave para la regulación de la vía PI3K-AKT y se encuentra mutada en la mayoría de los glioblastomas primarios lo que conlleva a su desregulación y por consiguiente a una funcionalidad alterada en las células que lo presentan. La  $\beta$ -catenina en la mayoría de las células de glioblastoma se encuentra mutada y está involucrada en los procesos de adhesión célula-célula, proliferación, migración entre otros. La alteración de esta vía genera un aumento de la  $\beta$ -catenina en el núcleo por lo que su activación es permanente lo que genera señalización constante. (Guo et al., 2020; Koul, 2008; Nager et al., 2012)

El hecho de que la expresión de estas proteínas clave en el proceso carcinogénico del glioblastoma se encuentren disminuidas, y aunado a los resultados obtenidos en viabilidad, proliferación y migración mencionados con anterioridad nos indica que esta molécula a base de hierro tiene efecto en cada uno de estos procesos en la línea de cáncer cerebral U251.

Con los resultados obtenidos del nivel de expresión de la proteína bcl-2, la cual es una proteína involucrada en la prevención de la inducción apoptótica y los resultados con la caspasa 3 la cual está inmersa en la actividad apoptótica de la vía intrínsecas, podemos inferir que se está llevando a cabo la muerte celular con ayuda de esta molécula a base de hierro. Por consiguiente, los procesos estudiados tales como disminución de la producción de  $H_2O_2$ , el nulo importe de la glutamina y el aumento en el exporte del glutamato son complementarios a los resultados obtenidos, pues el hecho de que se esté llevando a cabo la muerte celular, indica que varios procesos en esta línea celular, como los mencionados anteriormente, están afectados. (Carrington et al., 2017).

Con respecto al tratamiento por elección para este tipo de cáncer cerebral, la temozolomida; en los resultados de viabilidad, proliferación, migración y los preliminares de metabolismo, la concentración utilizada tal vez no fue la que adecuada para evidenciar un efecto negativo en los procedimientos mencionados a pesar de que varios autores han utilizado concentraciones próximas a  $100 \mu M$ . Aunque esto resultó en un claro ejemplo de que 1) La concentración de la organomolécula a 72 h es al menos

15 veces menor y se obtuvieron efectos favorables a una concentración de 6.5  $\mu\text{M}$  y 2) Se evidenció el nulo efecto de la terapia por elección a pesar de trabajarse a una concentración de 100  $\mu\text{M}$  lo que indica la necesidad de encontrar nuevas y novedosas terapias contra este tipo de neoplasias. (Borhani et al., 2017; Ni et al., 2019).

De manera general, los resultados de este trabajo nos indican que la molécula de ferrocenilselenoamida fue capaz de ejercer actividad citotóxica sobre células de glioblastoma a 24 y 72 h, además de que logró modificar el perfil metabólico de las líneas celulares y manifestó indicios de actividad apoptótica (Figura 34)

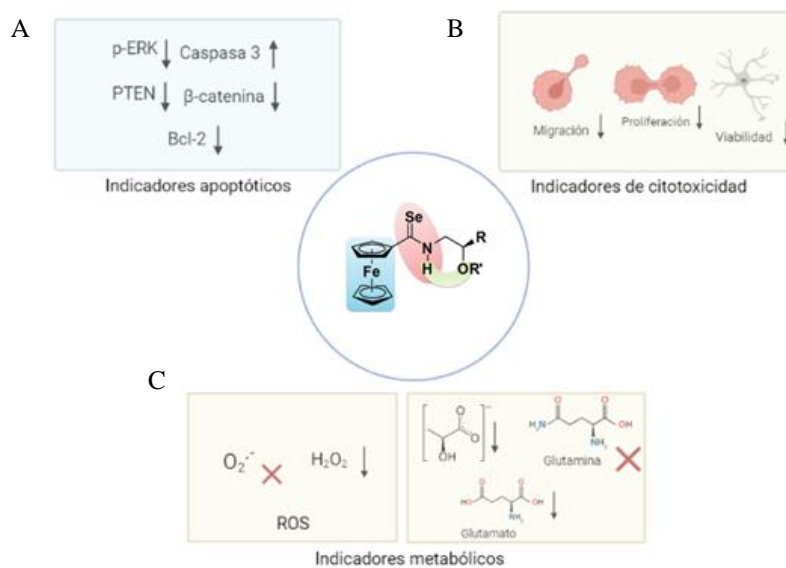


Figura 34. Modelo propuesto para la actividad de la ferrocenilselenoamida sobre la línea celular de glioblastoma humano U251. A) Reducción de niveles en proteínas clave como: p-ERK, PTEN,  $\beta$ -catenina y Bcl-2 y un aumento en los niveles de caspasa 3, indicadores de apoptosis. B) Disminución de la viabilidad, proliferación y migración. C) Disminución en metabolitos clave para el óptimo crecimiento tumoral; glutamina, glutamato y lactato además de variación en los niveles de  $\text{H}_2\text{O}_2$  y nulo cambio en  $\text{O}_2^{\cdot -}$

## 32 Conclusiones

La molécula de ferrocenilselenoamida, en la línea celular de glioblastoma humano U251 a una  $IC_{50}$  de 6.5  $\mu$ M y 3.7  $\mu$ M, ejerció actividad citotóxica, antiproliferativa y anti-migratoria. Igualmente, ejerció cambios en el metabolismo celular tales como disminución en el lactato extracelular, aumento del glutamato extracelular, alteraciones en el transporte de glutamina al interior de la célula y un descenso en la concentración extracelular de  $H_2O_2$ , aunque mantuvo intacta la concentración de  $O_2$ . Además, disminuyó la expresión de las proteínas Bcl-2,  $\beta$ -Catenina, PTEN y p-ERK e incrementó la expresión de la caspasa 3 sugiriendo muerte celular vía apoptosis.

### **33 Perspectivas**

Se plantea sustituir la línea celular renal embrionaria humana HEK293 por alguna línea cerebral no tumoral y efectuar los experimentos realizados para una óptima comparación.

Respecto al estudio de ROS, se piensa estudiar los posibles efectos secundarios y no la identificación *per se* de la molécula, dicho estudio podría ser la medición de la lipoperoxidación de la membrana.

Se plantea identificar a los componentes principales que marcaron la diferencia en el metabolismo de las células tumorales tanto del medio extracelular como del intracelular.

## 34 Referencias

1. Acevedo-Morantes, C., Meléndez, E., Singh, S. P., & Ramírez-vick, J. E. (2012). Cytotoxicity and Reactive Oxygen Species Generated by Ferrocenium and Ferrocene on MCF7 and MCF10A Cell Lines. *Cancer Science & Therapy*, 4(9), 271–275. <https://doi.org/10.4172/1948-5956.1000154>
2. Agnihotri, S., Burrell, K. E., Wolf, A., Jalali, S., Hawkins, C., Rutka, J. T., & Zadeh, G. (2013). Glioblastoma, a brief review of history, molecular genetics, animal models and novel therapeutic strategies. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, 61(1), 25–41. <https://doi.org/10.1007/s00005-012-0203-0>
3. Aguirre-Cruz, L., Rodríguez-Pérez, C. E., De la Cruz-Aguilera, D. L., Acosta-Castillo, G. I., Ruano-Calderón, L. Á., Martínez-Moreno, M., & Sotelo, J. (2020). Epidemiología descriptiva y cambios en la frecuencia de tumores astrocíticos en el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía de México. *Salud Pública de México*, 62(3, may-jun), 255. <https://doi.org/10.21149/10680>
4. Ajay K., M., & Lallan, M. (n.d.). *Ruthenium Chemistry* (M. Ajay Kumara & M. Lillan (eds.); 1st editio). Pan Stanford Publishing Pte. Ltd.
5. Altman, B. J., Stine, Z. E., & Dang, C. V. (2017). From Krebs to Clinic : Glutamine Metabolism to Cancer Therapy. *Nature Reviews Cancer*, 16(10), 619–634. <https://doi.org/10.1038/nrc.2016.71>.From
6. Ann L Coker. (2017). The Main Roles of Glutamte in Matebolism. *Physiology & Behavior*, 176(5), 139–148. <https://doi.org/10.1007/s10295-015-1665-y>.The
7. Bayin, N. S. (2014). Glioblastoma stem cells: Molecular characteristics and therapeutic implications. *World Journal of Stem Cells*, 6(2), 230. <https://doi.org/10.4252/WJSC.V6.I2.230>
8. Boonstra, J., & Post, J. A. (2004). Molecular events associated with reactive oxygen species and cell cycle progression in mammalian cells. *Gene*, 337(SUPPL.), 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2004.04.032>
9. Borhani, S., Mozdarani, H., Babalui, S., Mohsen, B., & Hassan, N. (2017). In Vitro Radiosensitizing Effects of Temozolomide on U87MG Cell Lines of Human Glioblastoma Multiforme. *Iranian Journal of Medical Sciences*, 42(3), 258–265. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5429494/>
10. Bradshaw, A., Wickremesekera, A., Brasch, H. D., Chibnall, A. M., Davis, P. F., Tan, S. T., & Itinteang, T. (2016). Cancer Stem Cells in Glioblastoma Multiforme. *Frontiers in Surgery*,

- 3, 1203–1217. <https://doi.org/10.3389/fsurg.2016.00048>
11. Calabi, F., & Milstein, C. (2000). The molecular biology of CD1. *Seminars in Immunology*, *12*(6), 503–509. <https://doi.org/10.1006/smim.2000.0271>
  12. Carrington, E. M., Zhan, Y., Brady, J. L., Zhang, J. G., Sutherland, R. M., Anstee, N. S., Schenk, R. L., Vikstrom, I. B., Delconte, R. B., Segal, D., Huntington, N. D., Bouillet, P., Tarlinton, D. M., Huang, D. C. S., Strasser, A., Cory, S., Herold, M. J., & Lew, A. M. (2017). Anti-apoptotic proteins BCL-2, MCL-1 and A1 summate collectively to maintain survival of immune cell populations both in vitro and in vivo. *Cell Death and Differentiation*, *24*(5), 878–888. <https://doi.org/10.1038/cdd.2017.30>
  13. Cellosaurus. (2021). *LN-229 (CVCL\_0393)*. [https://web.expasy.org/cellosaurus/CVCL\\_0393](https://web.expasy.org/cellosaurus/CVCL_0393)
  14. Chen, J., M. McKay, R., & Parada, L. F. (2012). Malignant Glioma: Lessons from Genomics, Mouse Models, and Stem Cells. *Cell*, *149*, 12.
  15. Cheng, G., & Zygourakis, K. (2011). Cell migration. *Methods Molecular Biology*, *769*, 77–98. <https://doi.org/10.1201/9781420008333-11>
  16. Choi, Y. K., & Park, K. G. (2018). Targeting glutamine metabolism for cancer treatment. *Biomolecules and Therapeutics*, *26*(1), 19–28. <https://doi.org/10.4062/biomolther.2017.178>
  17. Colen, C. B., Shen, Y., Ghoddoussi, F., Yu, P., Francis, T. B., Koch, B. J., Monterey, M. D., Galloway, M. P., Sloan, A. E., & Mathupala, S. P. (2011). Metabolic Targeting of Lactate Efflux by Malignant Glioma Inhibits Invasiveness and Induces Necrosis : An In Vivo Study 1. *Neoplasia*, *13*(7), 620–632. <https://doi.org/10.1593/neo.11134>
  18. Cortés, R., Tarrado-Castellarnau, M., Talancón, D., López, C., Link, W., Ruiz, D., Centelles, J. J., Quirante, J., & Cascante, M. (2014). A novel cyclometallated Pt(II)-ferrocene complex induces nuclear FOXO3a localization and apoptosis and synergizes with cisplatin to inhibit lung cancer cell proliferation. *Metallomics*, *6*(3), 622–633. <https://doi.org/10.1039/c3mt00194f>
  19. D'Alessio, A., Proietti, G., Sica, G., & Scicchitano, B. M. (2019). Pathological and molecular features of glioblastoma and its peritumoral tissue. *Cancers*, *11*(4). <https://doi.org/10.3390/cancers11040469>
  20. Doherty, J. R., Cleveland, J. L., Doherty, J. R., & Cleveland, J. L. (2013). Targeting lactate metabolism for cancer therapeutics Review series Targeting lactate metabolism for cancer therapeutics. *The Journal of Clinical Investigation*, *123*(9), 3685–3692. <https://doi.org/10.1172/JCI69741.transcription>
  21. Elmore, S. (2007). Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicologic Pathology*, *35*(4), 495–516. <https://doi.org/10.1080/01926230701320337>

22. Feitelson, M. A., Arzumanyan, A., Kulathinal, R. J., Blain, S. W., Holcombe, R. F., Mahajna, J., Marino, M., Martinez-Chantar, M. L., Nawroth, R., Sanchez-Garcia, I., Sharma, D., Saxena, N. K., Singh, N., Vlachostergios, P. J., Guo, S., Honoki, K., Fujii, H., Georgakilas, A. G., Bilslund, A., ... Nowsheen, S. (2015). Sustained proliferation in cancer: Mechanisms and novel therapeutic targets. *Seminars in Cancer Biology*, 35, S25–S54. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2015.02.006>
23. Feitelson, M. A., Arzumanyan, A., Kulathinal, R. J., Blain, S. W., Randall, F., Mahajna, J., Marino, M., Martinez-chantar, M. L., Nawroth, R., Sanchez-garcia, I., Sharma, D., Saxena, N. K., Singh, N., & Panagiotis, J. (2016). Sustained proliferation in cancer: mechanisms and novel therapeutic targets. *Cancer Biology*, 35, 1–78. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2015.02.006>. Sustained
24. Feoktistova, M., Geserick, P., & Leverkus, M. (2016). Crystal violet assay for determining viability of cultured cells. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2016(4), 343–346. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot087379>
25. Finley, L. W. S., & Thompson, C. B. (2015). The Metabolism of Cell Growth and Proliferation. In *The Molecular Basis of Cancer: Fourth Edition* (Fourth Edi). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4557-4066-6.00013-5>
26. Fiorina, V. J., Dubois, R. J., & Brynes, S. (1978). Ferrocenyl polyamines as agents for the chemoimmunotherapy of cancer. *J Med Chem*, 172(24), 393–395.
27. Fulda, S., & Debatin, K. M. (2006). Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. *Oncogene*, 25(34), 4798–4811. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209608>
28. Fulling, K. H., & Garcia, D. M. (1985). Anaplastic astrocytoma of the adult cerebrum. Prognostic value of histologic features. *Cancer*, 55(5), 928–931. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(19850301\)55:5<928::AID-CNCR2820550503>3.0.CO;2-3](https://doi.org/10.1002/1097-0142(19850301)55:5<928::AID-CNCR2820550503>3.0.CO;2-3)
29. Gasser, G., Ott, I., & Metzler-Nolte, N. (2011). Organometallic anticancer compounds. *Journal of Medicinal Chemistry*, 54(1), 3–25. <https://doi.org/10.1021/jm100020w>
30. Ghazi, S. O., Stark, M., Zhao, Z., & Mobley, B. C. (2013). Cell of origin determines tumor phenotype in an oncogenic Ras/p53 knockout transgenic model of high-grade glioma. *J Neuropathol Exp Neurol*, 71(8), 729–740. <https://doi.org/10.1097/NEN.0b013e3182625c02>. Cell
31. GIBCO. (2018). *Cell Culture Basics Handbook*.
32. Gorlia, T., Stupp, R., Brandes, A. A., Rampling, R. R., Fumoleau, P., Ditttrich, C., Campone,



- M. M., Twelves, C. C., Raymond, E., Hegi, M. E., Lacombe, D., & Van Den Bent, M. J. (2012). New prognostic factors and calculators for outcome prediction in patients with recurrent glioblastoma: A pooled analysis of EORTC Brain Tumour Group phase i and II clinical trials. *European Journal of Cancer*, 48(8), 1176–1184. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2012.02.004>
33. Groessl, M., Terenghi, M., Casini, A., Elviri, L., & Lobinski, R. (2010). Europe PMC Funders Group Reactivity of anticancer metallodrugs with serum proteins : new insights from size exclusion chromatography-ICP-MS and ESI- MS †. *J Anal At Spectrom*, 25(3), 305–313. <https://doi.org/10.1039/B922701F.Reactivity>
34. Guo, Y., Pan, W., Liu, S., Shen, Z., Xu, Y., & Hu, L. (2020). ERK/MAPK signalling pathway and tumorigenesis (Review). *Experimental and Therapeutic Medicine*, 1997–2007. <https://doi.org/10.3892/etm.2020.8454>
35. Gutiérrez Fernández, A., López Cortes, J. G., Ramírez Apan, M. T., & Cázares Marinero, J. de J. (2012). Ferrocenylselenoamides: Synthesis, Characterization and Cytotoxic Properties. *Journal of Medicinal Chemistry*.
36. Halliwell, B., & M.C. Gutteridge, J. (2015). *Free Radicals in Biology & Medicine* (Fifth edit).
37. Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*, 144(5), 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
38. Hanif, F., Muzaffar, K., Perveen, K., Malhi, S. M., & Simjee, S. U. (2017). Glioblastoma multiforme: A review of its epidemiology and pathogenesis through clinical presentation and treatment. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 18(1), 3–9. <https://doi.org/10.22034/APJCP.2017.18.1.3>
39. Hartinger, C. G., & Dyson, P. J. (2009). Bioorganometallic chemistry — from teaching paradigms to medicinal applications. *Chemical Society Reviews*, 391–401. <https://doi.org/10.1039/b707077m>
40. Hatzikirou, H., Basanta, D., Simon, M., Schaller, K., & Deutsch, A. (2010). Go or grow the key to the emergence of invasion in tumour progression.pdf. *Mathematical Medicine and Biology*, 29(1), 49–65. <https://doi.org/10.1093/imammb/dqq011>
41. Heffeter, P., Atil, B., Kryeziu, K., & Groza, D. (2013). The ruthenium compound KP1339 potentiates the anticancer activity of sorafenib in vitro and in vivo. *European Journal of Cancer*, 3366–3375. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2013.05.018>
42. Hermann, B., Dietrich, R., & Volker, A. (2009). Cancer Epidemiology: Vol 2, Modifiable Factors. *Methods in Molecular Biology*, 472, 467–475. <https://doi.org/10.1007/978-1-60327-492-0>

43. Holland, E. C. (2000). Glioblastoma multiforme: The terminator. *Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America*, 97(12), 6242–6244.
44. Institute, N. C. (2020). *What Is Cancer? A Collection Differences between Cancer Cells and Normal Cells*.
45. Işin, A., Direkoğlu, C., & Şah, M. (2016). Review of MRI-based Brain Tumor Image Segmentation Using Deep Learning Methods. *Procedia Computer Science*, 102(August), 317–324. <https://doi.org/10.1016/j.procs.2016.09.407>
46. Iwadate, Y. (2016). Epithelial-mesenchymal transition in glioblastoma progression. *Oncology Letters*, 11(3), 1615–1620. <https://doi.org/10.3892/ol.2016.4113>
47. Jaouen, G., Vessières, A., & Top, S. (2015). Ferrocifen type anti cancer drugs. *Chemical Society Reviews*, 44(24), 8802–8817. <https://doi.org/10.1039/c5cs00486a>
48. Jung, Y. S., & Park, J. II. (2020a). Wnt signaling in cancer: therapeutic targeting of Wnt signaling beyond  $\beta$ -catenin and the destruction complex. *Experimental and Molecular Medicine*, 52(2), 183–191. <https://doi.org/10.1038/s12276-020-0380-6>
49. Jung, Y. S., & Park, J. II. (2020b). Wnt signaling in cancer: therapeutic targeting of Wnt signaling beyond  $\beta$ -catenin and the destruction complex. In *Experimental and Molecular Medicine* (Vol. 52, Issue 2, pp. 183–191). <https://doi.org/10.1038/s12276-020-0380-6>
50. Kim, H. J., Park, J. W., & Lee, J. H. (2021). Genetic Architectures and Cell-of-Origin in Glioblastoma. *Frontiers in Oncology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.615400>
51. Klaunig, J. E., & Wang, Z. (2018). Oxidative stress in carcinogenesis. *Current Opinion in Toxicology*, 7, 116–121. <https://doi.org/10.1016/j.cotox.2017.11.014>
52. Koul, D. (2008). PTEN signaling pathways in glioblastoma. *Cancer Biology and Therapy*, 7(9), 1321–1325. <https://doi.org/10.4161/cbt.7.9.6954>
53. Lakhani, C. M. (2019). Medulloblastoma. *Physiology & Behavior*, 176(3), 139–148. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2017.03.040>
54. Lee, Y. S., & Lee, Y. S. (2020). Molecular characteristics of meningiomas. *Journal of Pathology and Translational Medicine*, 54(1), 45–63. <https://doi.org/10.4132/jptm.2019.11.05>
55. Li, J., & Yuan, J. (2008). Caspases in apoptosis and beyond. *Oncogene*, 27(48), 6194–6206. <https://doi.org/10.1038/onc.2008.297>
56. Li, X., Wu, C., Chen, N., Gu, H., Yen, A., Cao, L., Wang, E., & Wang, L. (2016). PI3K/Akt/mTOR signaling pathway and targeted therapy for glioblastoma. *Oncotarget*, 7(22), 33440–33450. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.7961>
57. Liang, J., Zhong, H., Yang, G., Vellaisamy, K., Ma, D., & Leung, C. (2017). Recent

- development of transition metal complexes with in vivo antitumor activity Pt. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 177(April), 276–286.  
<https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2017.06.002>
58. Liu, C., Chang, C., Hsueh, K., Su, H., & Chiou, T. (2018). Migration / Invasion of Malignant Gliomas and Implications for Therapeutic Treatment. *Internal Journal of Molecular Sciences*, 1, 1–24. <https://doi.org/10.3390/ijms19041115>
  59. Louis, D. N., Perry, A., Reifenberger, G., von Deimling, A., Figarella-Branger, D., Cavenee, W. K., Ohgaki, H., Wiestler, O. D., Kleihues, P., & Ellison, D. W. (2016). The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathologica*, 131(6), 803–820. <https://doi.org/10.1007/s00401-016-1545-1>
  60. Maity, B., Roy, M., Banik, B., Majumdar, R., Dighe, R. R., & Chakravarty, A. R. (2010). Ferrocene-Promoted Photoactivated DNA Cleavage and Anticancer Activity of Terpyridyl Copper ( II ) Phenanthroline Complexes. *Metallomics*, 16, 3632–3641. <https://doi.org/10.1021/om100524x>
  61. Mehta, S., & Lo Cascio, C. (2018). Developmentally regulated signaling pathways in glioma invasion. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 75(3), 385–402. <https://doi.org/10.1007/s00018-017-2608-8>
  62. MERCK. (2019). *MTT Assay Protocol for Cell Viability and Proliferation*. <https://www.sigmaaldrich.com/MX/es/technical-documents/protocol/cell-culture-and-cell-culture-analysis/cell-counting-and-health-analysis/cell-proliferation-kit-i-mtt>
  63. Mergenthaler, P., Ute, L., Dienel, G. A., & Meisel, A. (2014). Sugar for the brain: the role of glucose in physiological and pathological brain function. *Trends Neuroscience*, 36(10), 587–597. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2013.07.001.Sugar>
  64. Miller, K. D., Ostrom, Q. T., & Kruchko, C. (2021). Brain and Other Central Nervous System Tumor Statistics, 2021. *ACS Journal*.
  65. Mischel, P. S. (2019). Altered cellular metabolism in gliomas — an emerging landscape of actionable co-dependency targets. *Nature Reviews Cancer*, 20, 50–57. <https://doi.org/10.1038/s41568-019-0226-5>
  66. Mitra, K., Basu, U., Khan, I., Maity, B., Kondaiah, P., & Chakravarty, A. R. (2014). Remarkable anticancer activity of ferrocenyl-terpyridine platinum(ii) complexes in visible light with low dark toxicity. *Dalton Transactions*, 751–763. <https://doi.org/10.1039/c3dt51922h>
  67. Nager, M., Bhardwaj, D., Cantí, C., Medina, L., Nogués, P., & Herreros, J. (2012).  $\beta$ -Catenin Signalling in Glioblastoma Multiforme and Glioma-Initiating Cells . *Chemotherapy*

- Research and Practice*, 2012, 1–7. <https://doi.org/10.1155/2012/192362>
68. Natarajan, S. K., & Venneti, S. (2019). Glutamine metabolism in brain tumors. *Cancers*, 11(11). <https://doi.org/10.3390/cancers11111628>
  69. Ni, Q., Fan, Y., Zhang, X., Fan, H., & Li, Y. (2019). In vitro and in vivo Study on Glioma Treatment Enhancement by Combining Temozolomide with Calycosin and Formononetin. *Journal of Ethnopharmacology*, 242(November 2018), 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2019.01.023>
  70. Nieto, D., González-Vadillo, A. M., Bruña, S., Pastor, C. J., Ríos-Luci, C., León, L. G., Padrón, J. M., Navarro-Ranninger, C., & Cuadrado, I. (2012). Heterometallic platinum(ii) compounds with  $\beta$ -aminoethylferrocenes: Synthesis, electrochemical behaviour and anticancer activity. *Dalton Transactions*, 41(2), 432–441. <https://doi.org/10.1039/c1dt11358e>
  71. Noch, E., & Khalili, K. (2015). Molecular Mechanisms of Necrosis in Glioblastoma: The Role of Glutamate Excitotoxicity. *Cancer Biology Therapy*, 8(19), 1791–1797.
  72. Novohradský, V., Bergamo, A., Cocchietto, M., Zajac, J., Brabec, V., Mestroni, G., & Sava, G. (2014). Influence of the binding of reduced NAMI-A to human serum albumin on the pharmacokinetics. *Royal Society of Chemistry*. <https://doi.org/10.1039/c4dt02865a>
  73. Nox, S. U. J. K. (2008). BIOLOGY CONTRIBUTION SELENITE TREATMENT INHIBITS LAPC-4 TUMOR GROWTH AND PROSTATE-SPECIFIC ANTIGEN SECRETION IN A XENOGRAFT MODEL OF HUMAN PROSTATE CANCER RUMI S . B HATTACHARYYA , P H . D . , Y B RYAN H USBECK , P H . D . ,\* D AVID F ELDMAN , M . D . , y. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*, 72(3), 935–940. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2008.07.005>
  74. Osella, D. (2000). On the mechanism of antitumor activity of ferrocenium derivatives.pdf. *Inorganica Chimica Acta*.
  75. Patra, M., & Gasser, G. (2017). The medicinal chemistry of ferrocene and its derivatives. *Nature Reviews Chemistry*, 1(9). <https://doi.org/10.1038/s41570-017-0066>
  76. Pedarzani, P., & Stocker, M. (2008). Molecular and cellular basis of small- and intermediate-conductance, calcium-activated potassium channel function in the brain. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 65(20), 3196–3217. <https://doi.org/10.1007/s00018-008-8216-x>
  77. Perillo, B., Di Donato, M., Pezone, A., Di Zazzo, E., Giovannelli, P., Galasso, G., Castoria, G., & Migliaccio, A. (2020). ROS in cancer therapy: the bright side of the moon. *Experimental and Molecular Medicine*, 52(2), 192–203. <https://doi.org/10.1038/s12276-020-0384-2>

78. Prager, B. C., Bhargava, S., Mahadev, V., Hubert, C. G., & Rich, J. N. (2020). Glioblastoma Stem Cells: Driving Resilience through Chaos. *Trends in Cancer*, 6(3), 223–235. <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2020.01.009>
79. Promega. (2017). Glutamine / Glutamate-Glo™ Assay Glutamine / Glutamate-Glo™ Assay. *Promega*.
80. Quinones, A., & Le, A. (2018). The multifaceted metabolism of glioblastoma. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1063, 59–72. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-77736-8\\_4](https://doi.org/10.1007/978-3-319-77736-8_4)
81. R. Buettner, G. (2012). Superoxide Dismutase in Redox Biology: The Roles of Superoxide and Hydrogen Peroxide. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 11(4), 341–346. <https://doi.org/10.2174/187152011795677544>
82. Ram, M. T., & Jesu, J. De. (2012). Ferrocenylselenoamides: Synthesis, Characterization and Cytotoxic Properties. *Journal of Medicinal Chemistry*.
83. Ries, L. a G., Young, J. L., Keel, G. E., Eisner, M. E., Lin, Y. D., & Horner, M.-J. D. (2007). Cancer Survival Among Adults: US SEER PRogram, 1988-2001. *SEER Survival Monograph*, 07, 1988–2001.
84. Rinaldi, M., Caffo, M., Minutoli, L., Marini, H., Abbritti, R. V., Squadrito, F., Trichilo, V., Valenti, A., Barresi, V., Altavilla, D., Passalacqua, M., & Caruso, G. (2016). ROS and brain gliomas: An overview of potential and innovative therapeutic strategies. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(6). <https://doi.org/10.3390/ijms17060984>
85. Salmain, M., & Metzler-Nolte, N. (2008). of Ferrocene \*. In *Amino Acids* (pp. 1–141). Jhon whiley & Sons.
86. San-millán, I., & Brooks, G. A. (2017). Reexamining cancer metabolism : lactate production for carcinogenesis could be the purpose and explanation of the Warburg Effect. *Carcinogenesis*, 38(2), 119–133. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgw127>
87. Scalise, M., Pochini, L., Galluccio, M., Console, L., & Indiveri, C. (2020). Glutamine transporters as pharmacological targets: From function to drug design. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 15(2), 207–219. <https://doi.org/10.1016/j.ajps.2020.02.005>
88. Scarpa, E., & Mayor, R. (2016). Collective cell migration in development. *Journal of Cell Biology*, 212(2), 143–155. <https://doi.org/10.1083/jcb.201508047>
89. Serrano Cardona, L., & Muñoz Mata, E. (2013). Paraninfo Digital. *Early Human Development*, 83(1), 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.earlhumdev.2006.05.022>
90. Shergalis, A., Bankhead, A., Luesakul, U., Muangsinsin, N., & Neamati, N. (2018). Current challenges and opportunities in treating glioblastomas. *Pharmacological Reviews*, 70(3),

- 412–445. <https://doi.org/10.1124/pr.117.014944>
91. Shimokawa, H., & Satoh, K. (2017). Reactive oxygen species in the cardiovascular system. *Reactive Oxygen Species in Biology and Human Health*, 2013, 287–303. <https://doi.org/10.1201/b20228>
  92. Shukla, G., Alexander, G. S., Bakas, S., Nikam, R., Talekar, K., Palmer, J. D., & Shi, W. (2017). Advanced magnetic resonance imaging in glioblastoma: A review. *Chinese Clinical Oncology*, 6(4), 1–12. <https://doi.org/10.21037/cco.2017.06.28>
  93. Singh, S. K., Clarke, I. D., Terasaki, M., Bonn, V. E., Hawkins, C., Squire, J., & Dirks, P. B. (2003). Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Research*, 63(18), 5821–5828.
  94. Song, Q., Merajver, S. D., & Li, J. Z. (2015). Cancer classification in the genomic era: five contemporary problems. *Human Genomics*, 9, 27. <https://doi.org/10.1186/s40246-015-0049-8>
  95. Sontheimer, H., & Sontheimer, H. (2015). Chapter 9 – Brain Tumors. *Diseases of the Nervous System*, 259–288. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800244-5.00009-4>
  96. Spectus, C. O. N. (2010). Functional Mimics of Glutathione Peroxidase : Bioinspired Synthetic Antioxidants. *Accounts of Chemical Research*, 43(11).
  97. Takei, H., Rouah, E., & Ishida, Y. (2016). Brain metastasis: clinical characteristics, pathological findings and molecular subtyping for therapeutic implications. *Brain Tumor Pathology*, 33(1), 1–12. <https://doi.org/10.1007/s10014-015-0235-3>
  98. Taylor, P., Herishanu, Y., Gibellini, F., Njuguna, N., Hazan-halevy, I., Bern, S., Keyvanfar, K., Lee, E., & Wilson, W. (2015). Activation of CD44 , a receptor for extracellular matrix components , protects chronic lymphocytic leukemia cells from spontaneous and drug induced apoptosis through MCL-1. *Leukemia & Lymphoma*, August. <https://doi.org/10.3109/10428194.2011.569962>
  99. Toosi, K. (2014). Reactive Oxygen Species in Cancer. In *Bone* (Vol. 23, Issue 1). <https://doi.org/10.3109/10715761003667554>. Reactive
  100. Tudek, B., Winczura, A., Janik, J., Siomek, A., Foksinski, M., & Oliński, R. (2010). Involvement of oxidatively damaged DNA and repair in cancer development and aging. *American Journal of Translational Research*, 2(3), 254–284.
  101. Turrens, J. F. (2003). Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *Journal of Physiology*, 552(2), 335–344. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2003.049478>
  102. Valdés-Rives, S. A., Casique-Aguirre, D., Germán-Castelán, L., Velasco-Velázquez, M. A., & González-Arenas, A. (2017). Apoptotic Signaling Pathways in Glioblastoma and

- Therapeutic Implications. *BioMed Research International*, 2017.  
<https://doi.org/10.1155/2017/7403747>
103. Vander Heiden, M. G. (2011). Targeting cancer metabolism: A therapeutic window opens. *Nature Reviews Drug Discovery*, 10(9), 671–684. <https://doi.org/10.1038/nrd3504>
104. Verhaak, R. G. W., Hoadley, K. A., Purdom, E., Wang, V., Qi, Y., Wilkerson, M. D., Miller, C. R., Ding, L., Golub, T., Mesirov, J. P., Alexe, G., Lawrence, M., Kelly, M. O., Tamayo, P., Weir, B. A., Gabriel, S., Winckler, W., Gupta, S., Jakkula, L., ... Atlas, G. (2010). Article Integrated Genomic Analysis Identifies Clinically Relevant Subtypes of Glioblastoma Characterized. *Cancer Cell*, 17(1), 98–110. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2009.12.020>
105. Warburg, O. (1924). *Über den Stoffwechsel der Carcinomzelle*.
106. Wesseling, P., & Capper, D. (2018). WHO 2016 Classification of gliomas. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 44(2), 139–150. <https://doi.org/10.1111/nan.12432>
107. Xie, Q., Mittal, S., & Berens, M. E. (2014). Targeting adaptive glioblastoma: An overview of proliferation and invasion. *Neuro-Oncology*, 16(12), 1575–1584. <https://doi.org/10.1093/neuonc/nou147>
108. Yang, L., Venneti, S., & Nagrath, D. (2017). Glutaminolysis: A Hallmark of Cancer Metabolism. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 19, 163–194. <https://doi.org/10.1146/annurev-bioeng-071516-044546>
109. Yao, M., Li, S., Wu, X., Diao, S., Zhang, G., He, H., Bian, L., & Lu, Y. (2018). Cellular origin of glioblastoma and its implication in precision therapy. *Cellular and Molecular Immunology*, 737–739. <https://doi.org/10.1038/cmi.2017.159>
110. Yi, H., Talmon, G., & Wang, J. (2020). Glutamate in cancers: from metabolism to signaling. *The Journal of Biomedical Research*, 11. <https://doi.org/10.7555/jbr.34.20190037>
111. Zhang, Y., Dube, C., Gibert, M., Cruickshanks, N., Wang, B., Coughlan, M., Yang, Y., Setiady, I., Deveau, C., Saoud, K., Grello, C., Oxford, M., Yuan, F., & Abounader, R. (2018). The p53 pathway in glioblastoma. *Cancers*, 10(9). <https://doi.org/10.3390/cancers10090297>
112. Zhou, W., & Wahl, D. R. (2019). Metabolic abnormalities in glioblastoma and metabolic strategies to overcome treatment resistance. *Cancers*, 11(9). <https://doi.org/10.3390/cancers11091231>