

**Efectos osteogénicos y antitumorales
de compuestos de vanadio
Relevancia en osteoblastos en cultivo**



"Freja (Vanadis)" by Nadja Rehder, April 2004

**Síntesis, caracterización fisicoquímica
y bioactividad *in vitro*
de nuevos compuestos de vanadio
Potenciales aplicaciones farmacológicas**

**EFFECTOS FARMACOLÓGICOS DE
COMPUESTOS DE VANADIO**

Insulinomiméticos

Osteogénicos

Antitumorales

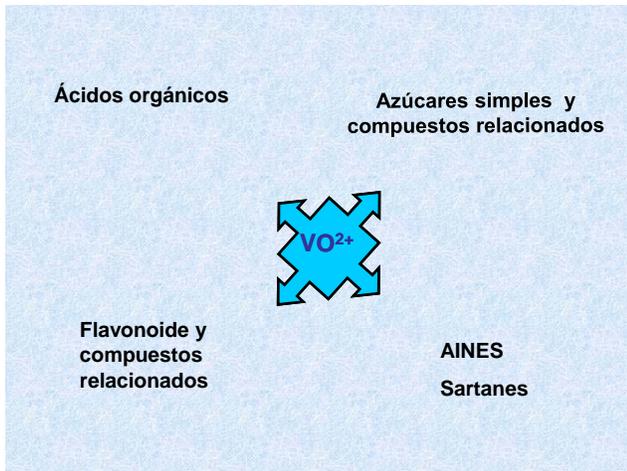
Esquema de actividades

-Selección y/o modificación química de ligandos de interés biológico o con actividad farmacológica propia.
-Síntesis de complejos metálicos con los ligandos seleccionados.
-Bioactividad de ligandos y complejos en cultivos celulares

Etapa I
Síntesis y caracterización
Estudios en solución: estabilidad
Caracterización fisicoquímica

Etapa II
Bioactividad
II1. En sistemas acelulares
a) FAL
b) SOD y catalasa
c) Clivaje de ADN-Actividad Nucleasa.

Etapa II
Bioactividad
II.2 **Screening** de la actividad biológica en cultivos celulares

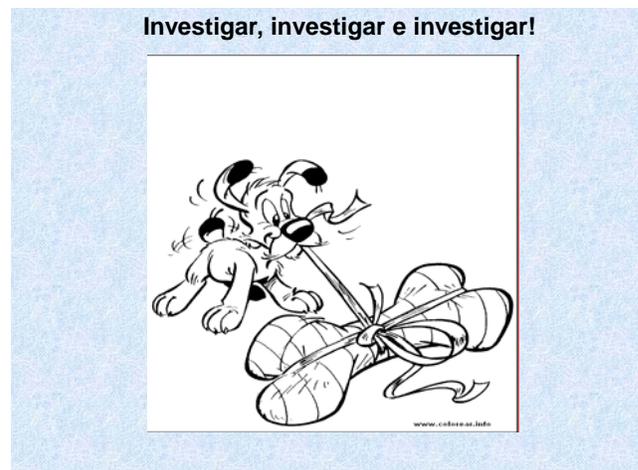
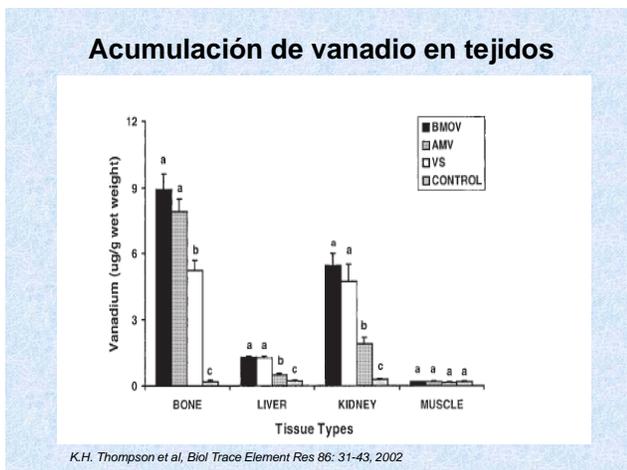


ALMACENAMIENTO DEL VANADIO EN VERTEBRADOS

Hígado 1 - 3 µg/g

Riñón 2,1 - 5,2 µg/g

Tejido óseo 10 - 26 µg/g



HUESOS

El hueso es un órgano firme, duro y resistente que forma parte del esqueleto de los vertebrados

Con una estructura interna compleja pero muy funcional que determina su morfología, los huesos son plásticos y livianos aunque muy resistentes y duros.



Componentes del tejido óseo

Matriz orgánica

- Colágeno
- Proteínas no colágenas
 - Fibronectina
 - Osteopontina
- Glucosaminoglicanos

Fase mineral inorgánica

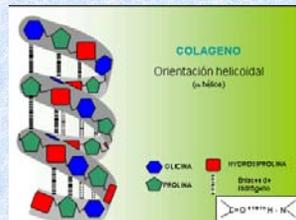
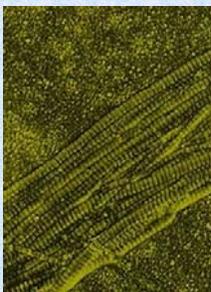
- Hidroxiapatita (Fosfato y cálcico)
- Citrato
- Bicarbonato
- Fluoruro
- Magnesio
- Sodio

Células

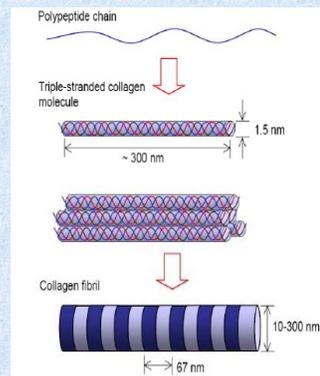
- Osteoblastos
- Osteocitos
- Osteoclastos

MATRIZ EXTRACELULAR

COLÁGENO

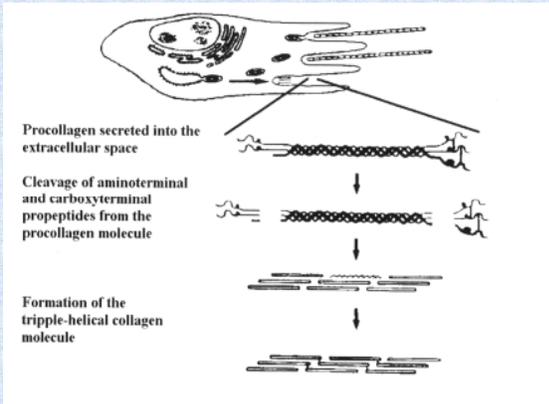


Estructura del colágeno tipo I



Estructura esquemática de la fibra de del colágeno tipo I. Las moléculas en hélice del colágeno se forman a partir de tres cadenas polipeptídicas y éstas se asocian lateralmente para formar las fibras de colágeno que presentan una característica estructura con bandas.

Síntesis y secreción de colágeno



“Fugas” y Colágeno

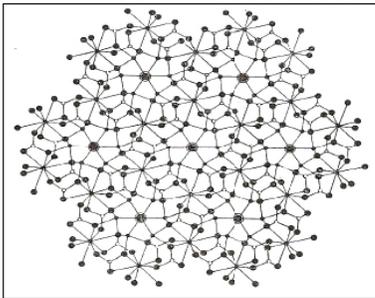


“Esto es una “fuga” y como pueden ver, es similar a la estructura del colágeno tipo I !!”

J.S.Bach

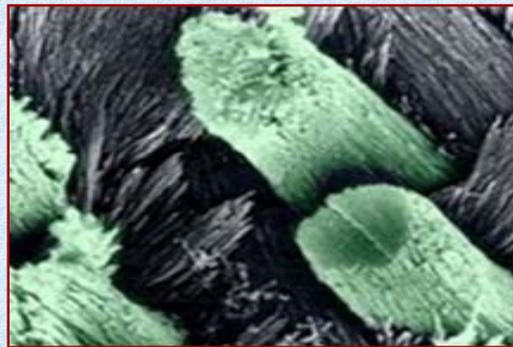


FASE MINERAL INORGÁNICA DEL HUESO Estructura de la Hidroxiapatita



Red de hidroxiapatita (Tomada de M. Massuyes, J.C. Trombe, G. Bonel, G. Montel, Bull. Soc. Chim. Fr. 1969, 7, 2308.

Cristales de Hidroxiapatita



Scanning Electron Micrograph de cristales de hidroxiapatita en dentina

Cristales de hidroxiapatita en la MEC

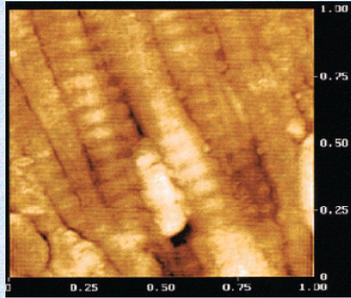
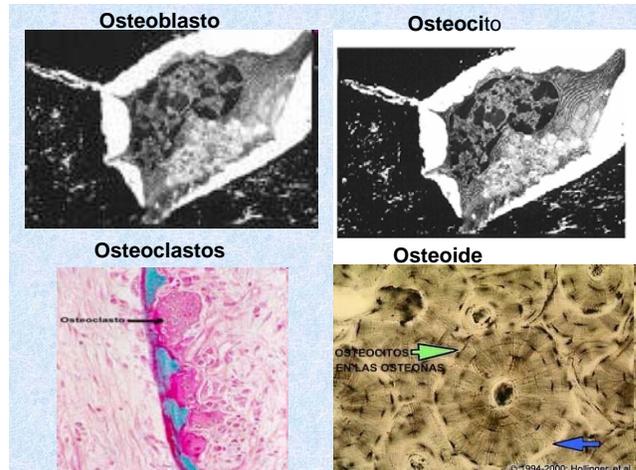
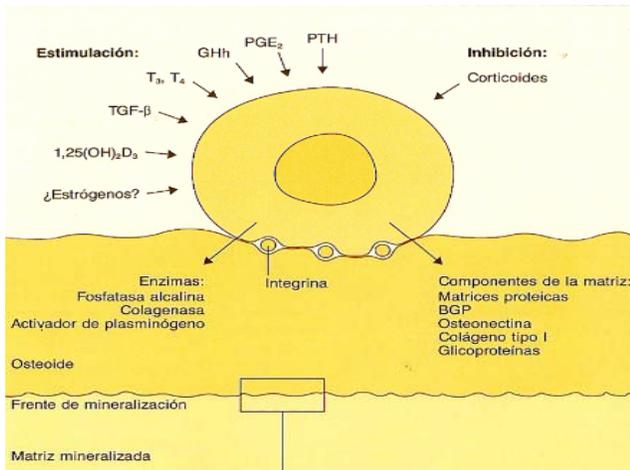
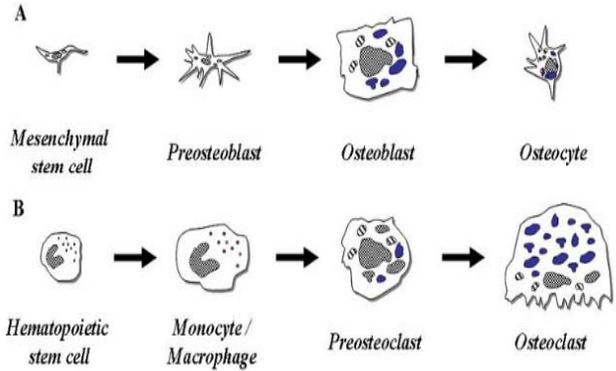


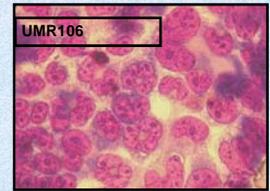
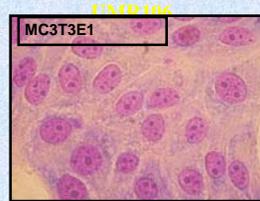
Imagen de alta resolución de 1micrón cuadrado por AFM donde se observan las fibras de colágeno y un cristal de hidroxiapatita

Formación de osteoblastos y osteoclastos



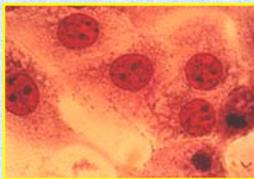
Actividad osteogénica de los compuestos de vanadio en cultivos de osteoblastos

LÍNEAS OSTEABLÁSTICAS



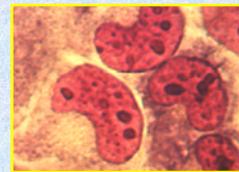
Línea celular MC3T3-E1 obtenida de calvaria de ratón

Preosteoblastos $\xrightarrow{\text{AA} + \beta\text{-GP}}$ Osteoblastos

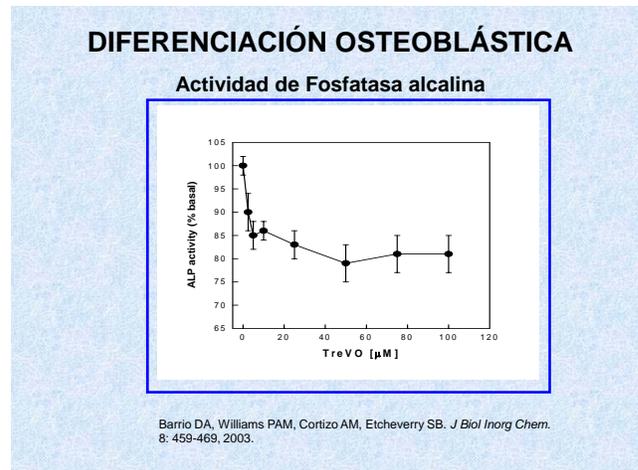
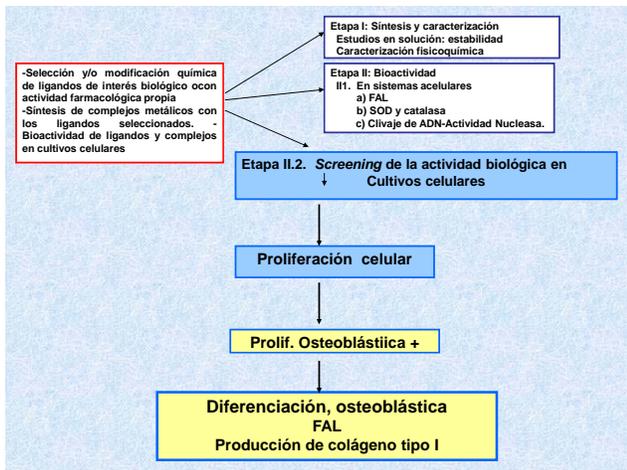
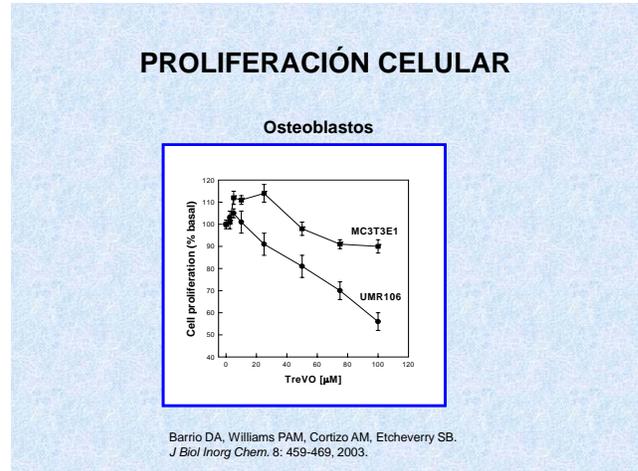
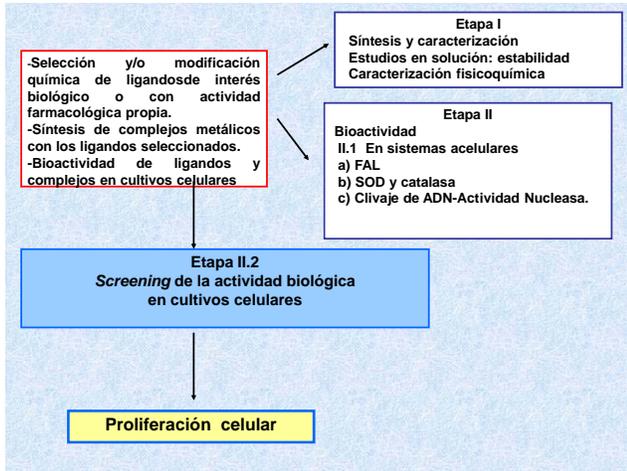


Crecen en monocapa
Los niveles de FAL aumentan con la diferenciación
Inhibición por contacto

Línea celular UMR106 obtenida de osteosarcoma de rata

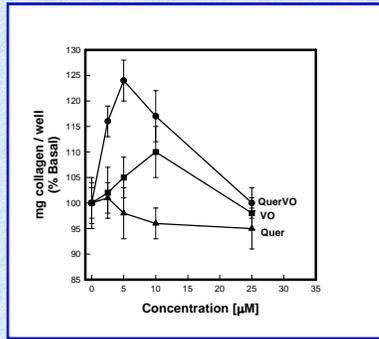


- Expresan marcadores de fenotipo osteoblástico diferenciado (FAL ósea, colágeno tipo I)
- No mineralizan la matriz secretada
- Alta tasa de replicación

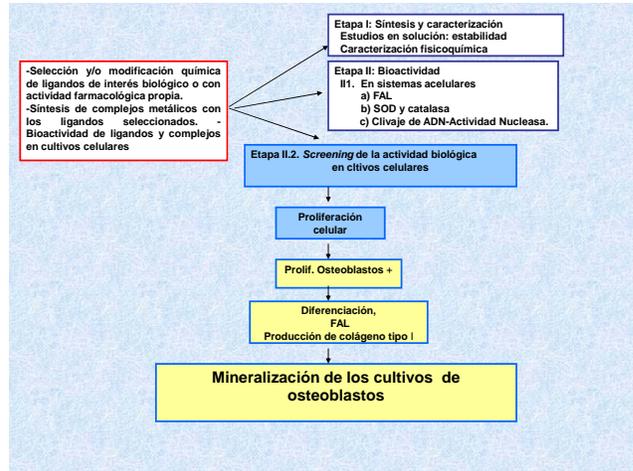


DIFERENCIACIÓN OSTEoblástica

Producción de colágeno tipo I



FerrerEG, Salinas MV, Correa MJ, Naso L, Barrio DA, Etcheverry SB, Lezama L, Rojo T, Williams PAM. *J Biol Inorg Chem* 11: 791-801, 2006

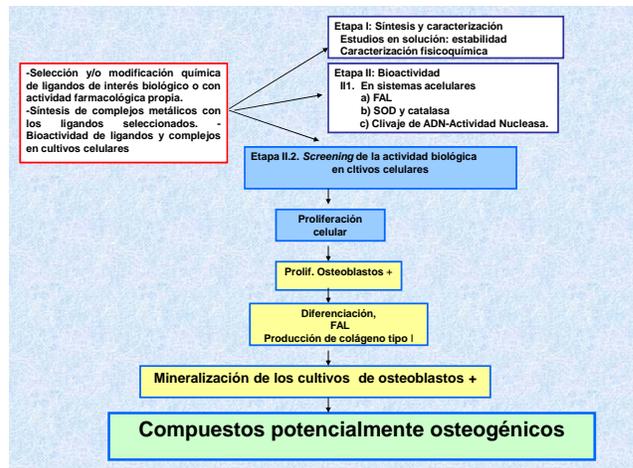


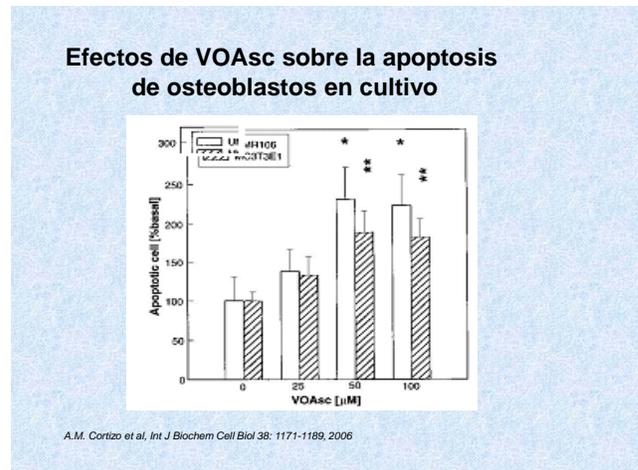
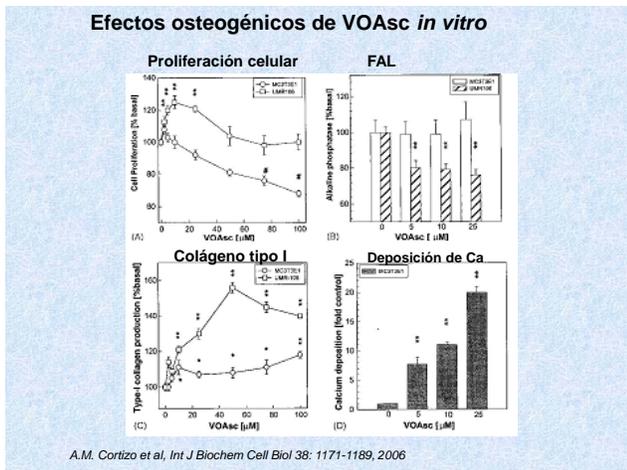
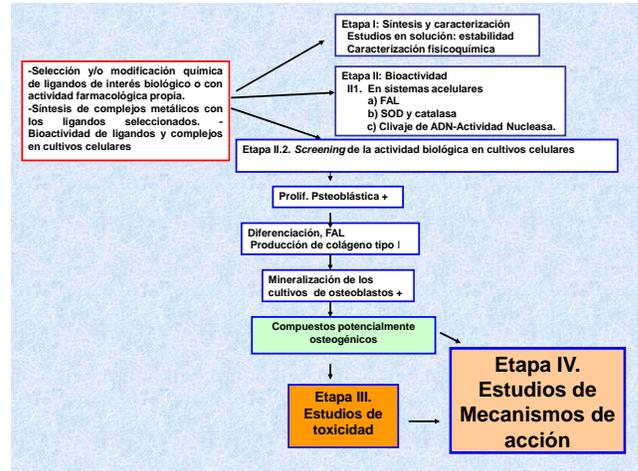
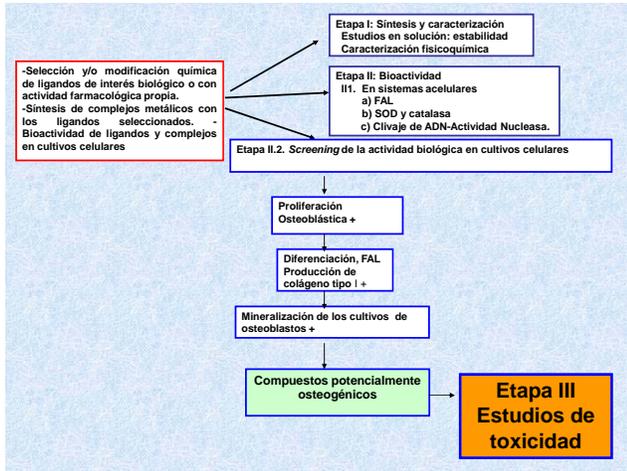
MINERALIZACIÓN DE LA MEC

Células MC3T3-E1

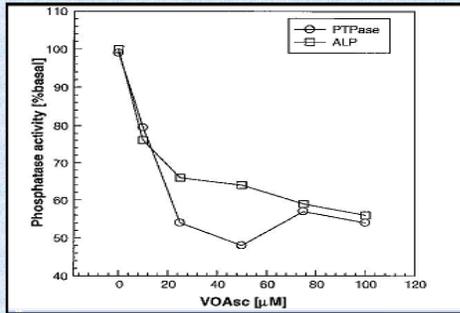


Vanadium and bone. Relevance of vanadium compounds in bone cells Etcheverry SB and Barrio DA- En: Vanadium: The versatile element. Kustin K, Costa Pessoa J and Crans DC (Ed.s). American Chemical Society Series 974. Vol 15: 204-216, 2007



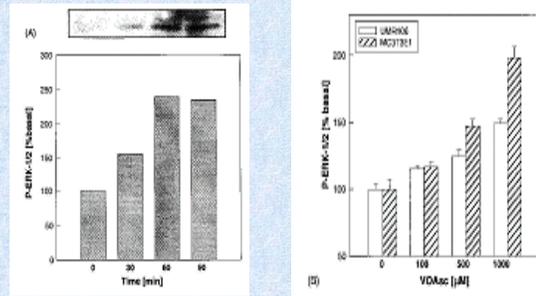


Efectos de VOAsc sobre la actividad de fosfatasa



A.M. Cortizo et al, *Int J Biochem Cell Biol* 38: 1171-1189, 2006

Efectos en el tiempo y de la concentración de VOAsc sobre las ERKs

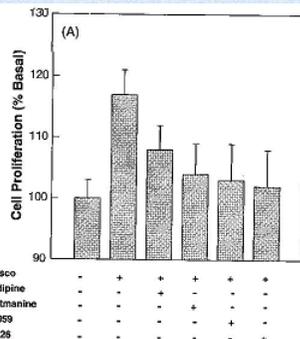


A.M. Cortizo et al, *Int J Biochem Cell Biol* 38: 1171-1189, 2006

Efecto de VOAsc sobre la proliferación celular en presencia de inhibidores específicos

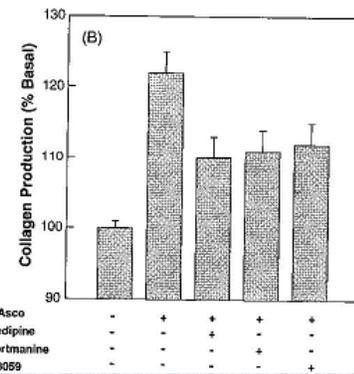
Los inhibidores de la vía de las MAPK inhibieron parcialmente la proliferación osteoblástica estimulada por VOAsc

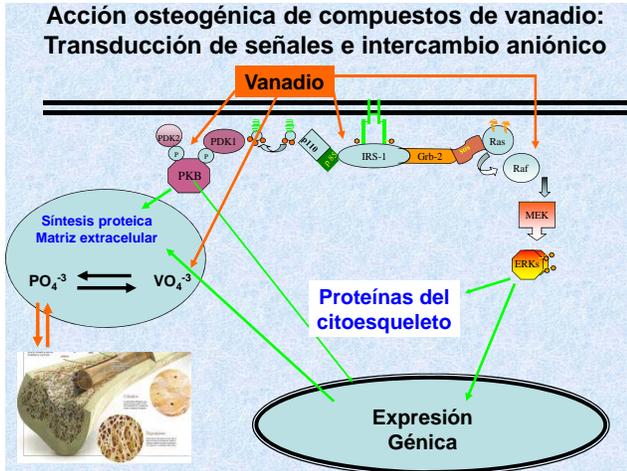
Lo mismo ocurre con el inhibidor de PI-3K y con el bloqueador de los canales de Ca



A.M. Cortizo et al, *Int J Biochem Cell Biol* 38: 1171-1189, 2006

Efecto de VOAsc sobre la síntesis de colágeno en presencia de inhibidores específicos



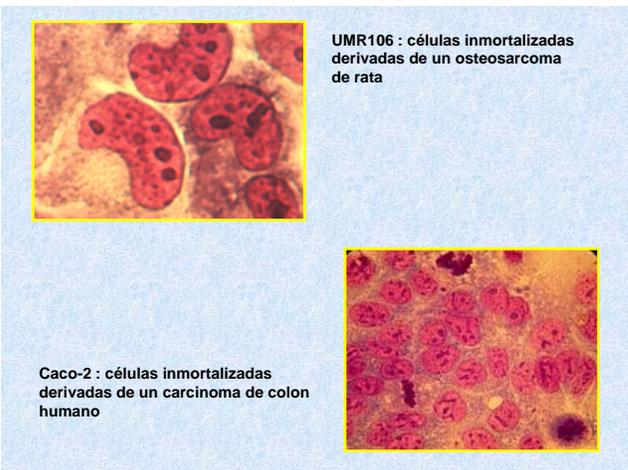


Conclusiones de los resultados sobre efectos osteogénicos de compuestos de vanadio en cultivos de osteoblastos

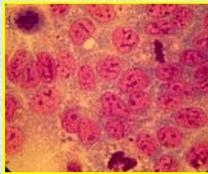
Algunos compuestos de vanadilo con diversos ligandos orgánicos mostraron poseer potenciales efectos osteogénicos *in vitro* promoviendo la síntesis de colágeno y la mineralización de la matriz ósea.

La activación de la vía de las MAPK y de la PI-3K así como los canales de Ca intervienen en el proceso de secreción de colágeno y de mineralización de la MEC

Efectos antitumorales de compuestos de vanadio en cultivos celulares

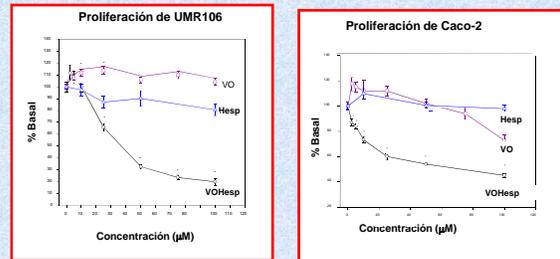


Línea celular Caco-2 obtenida de adenocarcinoma de colon humano

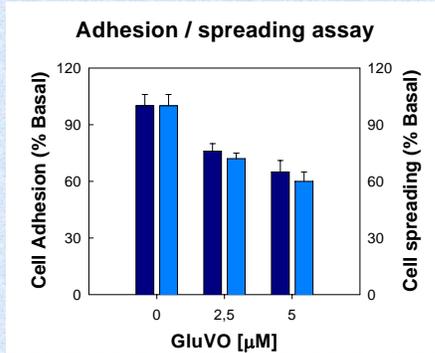


- Crecen agrupadas
- Alta tasa de replicación
- La diferenciación ocurre en aprox. 15 días de cultivo

EFFECTO ANTIPROLIFERTIVO DE COMPUESTOS DE VANADIO EN CÉLULAS TUMORALES EN CULTIVO

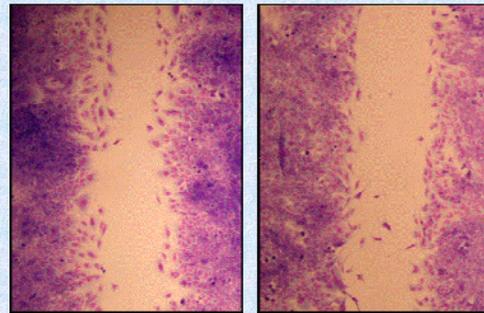


EFFECTOS DEL VANADIO SOBRE LA MIGRACIÓN Y EL SPREADING DE CÉLULAS TUMORALES



Molinuevo, MS, Cortizo AM, Etcheverry SB. *Cancer Chemother Pharmacol* 61:767-73, 2008

ENSAYO DE LA HERIDA

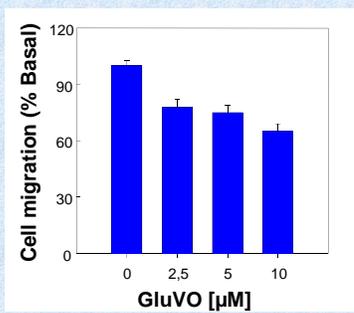


Control

5 μM GluVO

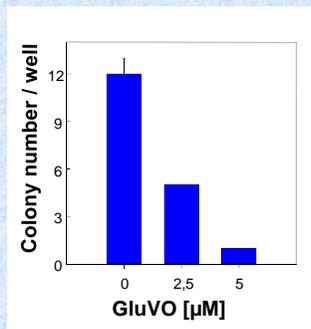
Molinuevo MS, Cortizo AM, Etcheverry SB, 5th International Vanadium Symposium, USA, 2006

MIGRACIÓN CELULAR DESDE LA HERIDA

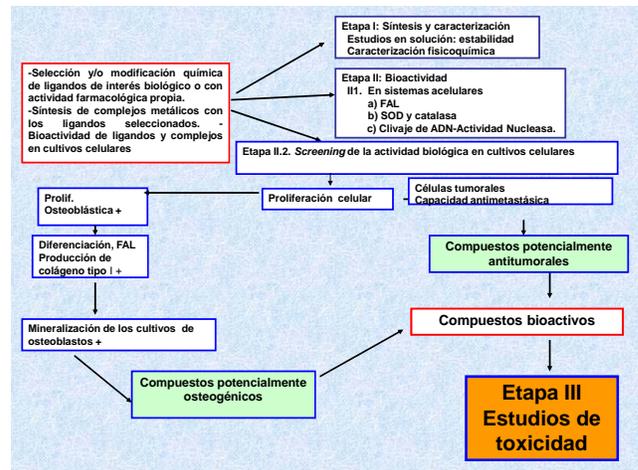
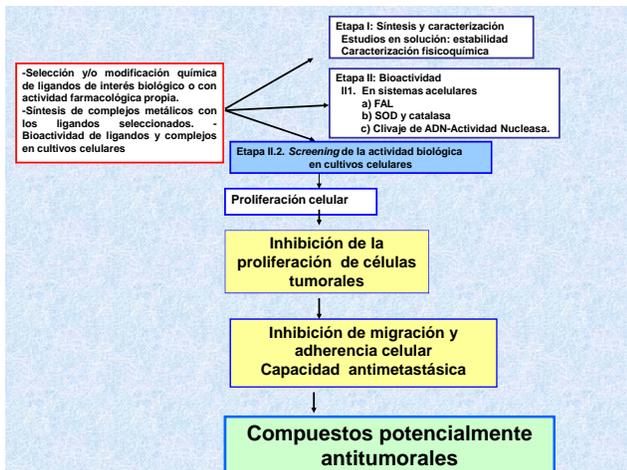
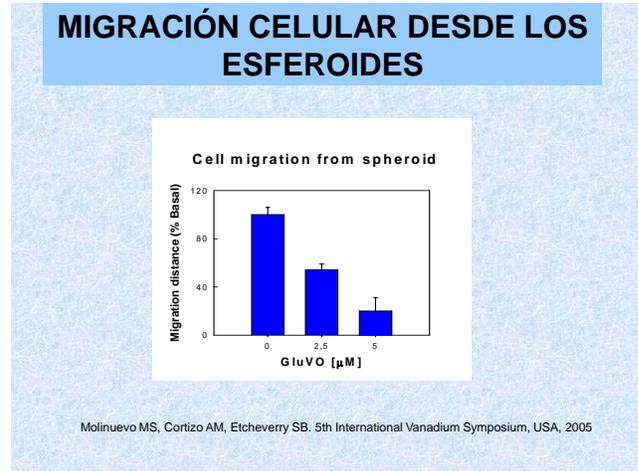
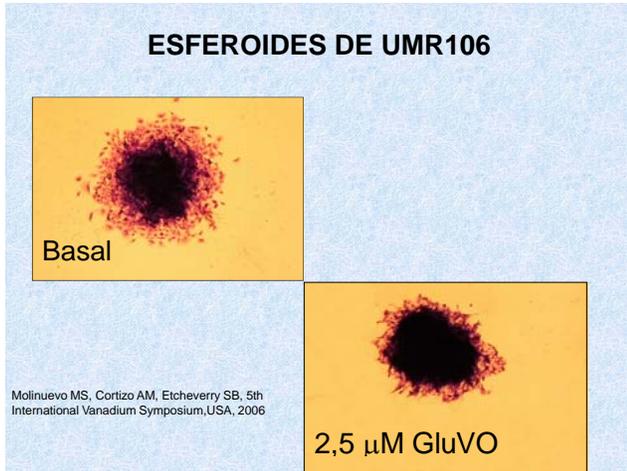


Molinuevo, MS, Cortizo AM, Etcheverry SB. *Cancer Chemother Pharmacol* 61:767-73, 2008

CLONOGENICIDAD



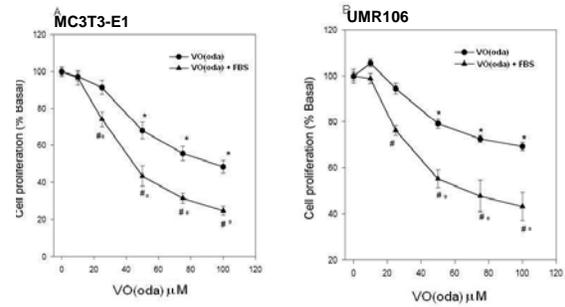
Molinuevo, MS, Cortizo AM, Etcheverry SB. *Cancer Chemother Pharmacol* 61:767-73, 2008



ESTUDIOS DE TOXICIDAD

- Viabilidad celular
- Alteraciones de la morfología celular
- Alteraciones del citoesqueleto

REVERSIBILIDAD DE EFECTOS TÓXICOS

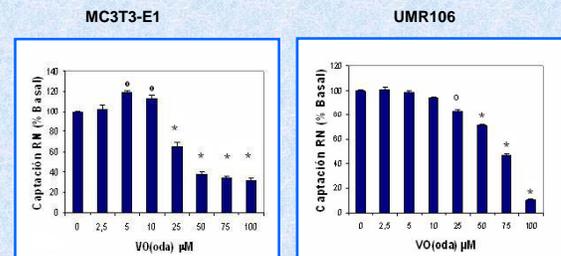


Iñeira J, Di Virgilio AL, Barrio DA, Muglia CI, Bruzzone L, Etcheverry SB. *Med Chem Res*. 2009.

Viabilidad celular

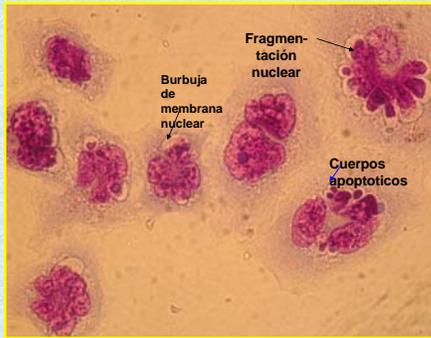
- Ensayo del cristal violeta
- Ensayo del Rojo Neutro
- Ensayo del MTT

VIABILIDAD CELULAR Ensayo del Rojo neutro



Rivadeneira J, Di Virgilio AL, Barrio DA, Muglia CI, Bruzzone L, Etcheverry SB. *Med Chem (En prensa, 2009)*.

ALTERACIONES MORFOLÓGICAS

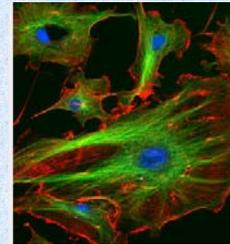


Etcheverry SB, Ferrer EG, Naso L, Rivadeneira J, Salinas V, Williams PAM. *J Biol Inorg Chem* 13: 435-447, 2008

CITOESQUELETO

COMPONENTES

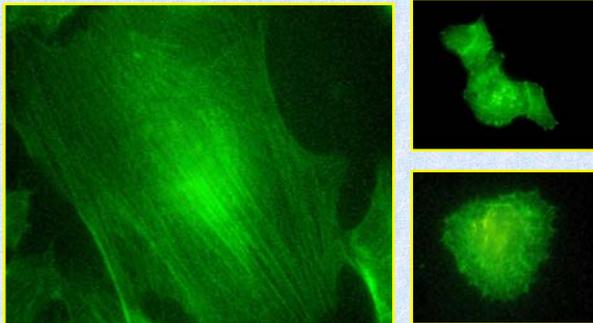
Microfilamentos
Filamentos intermedios
Microtúbulos



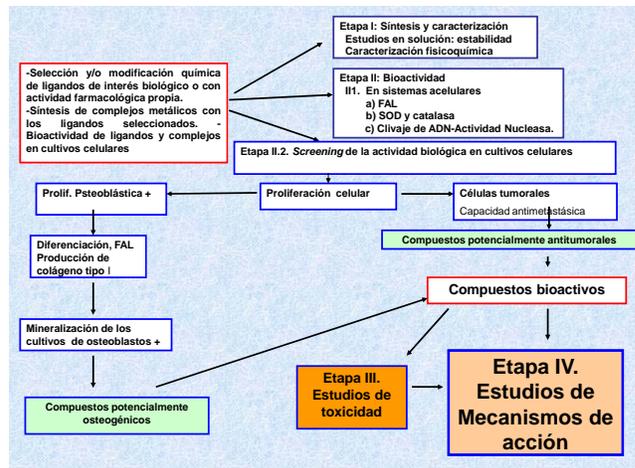
FUNCIONES

Rol: Transporte intracelular de organelas
División celular
Mantenimiento de la forma y de la función celular

ALTERACIÓN DEL CITOESQUELETO



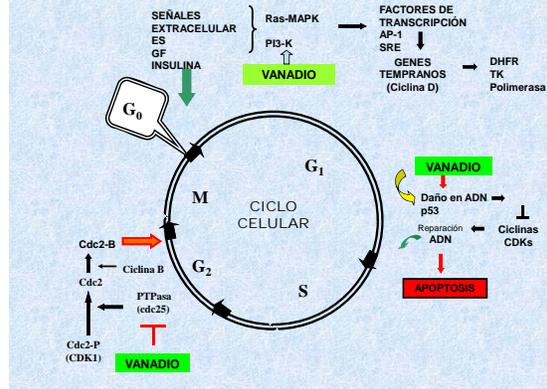
Rivadeneira J, Di Virgilio AL, Barrio DA, Muglia CI, Bruzzone L, Etcheverry SB. *Med Chem* (En prensa, 2009).



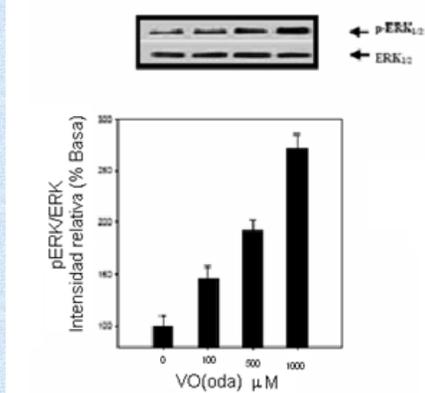
MECANISMOS DE ACCIÓN

- Activación de la vía de las ERKs
- Estrés oxidativo y status redox celular
- Apoptosis

Consecuencias de la inhibición de PTPasas

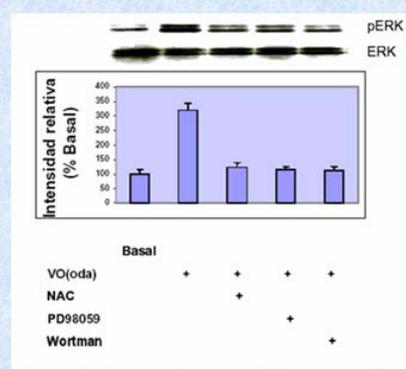


Activación de las ERKs por VO(oda) en osteoblastos



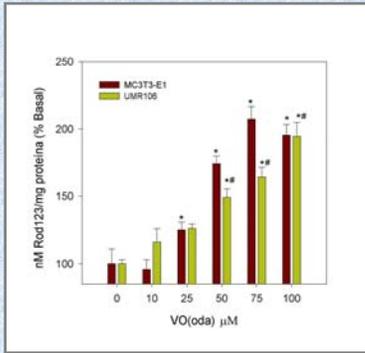
Rivadeneira J, Di Virgilio AL, Barrio DA, Muglia CI, Bruzzone L, Etcheverry SB. *Med Chem* (En prensa, 2009).

Activación de las ERKs e inhibidores



Rivadeneira J, Di Virgilio AL, Barrio DA, Muglia CI, Bruzzone L, Etcheverry SB. *Med Chem* (En prensa, 2009).

ESTRÉS OXIDATIVO VO(oda)



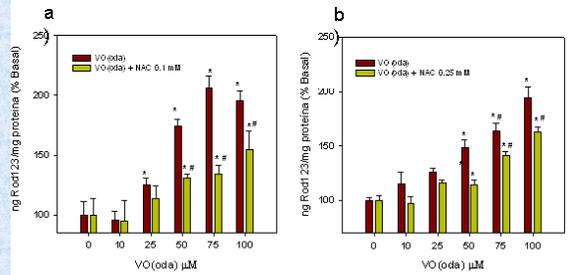
Rivadeneira J, Di Virgilio AL, Barrio DA, Muglia CI, Bruzzone L, Etcheverry SB. *Med Chem* (En prensa, 2009).

ESTRÉS OXIDATIVO Y STATUS REDOX CELULAR

Efecto de NAC

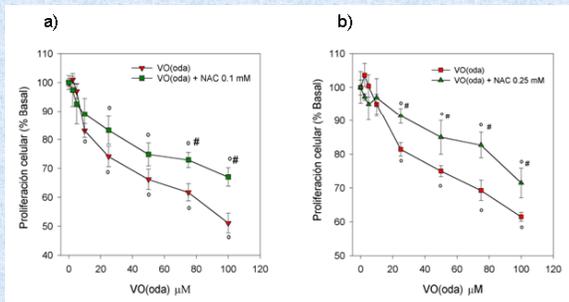
MC3T3-E1

UMR106



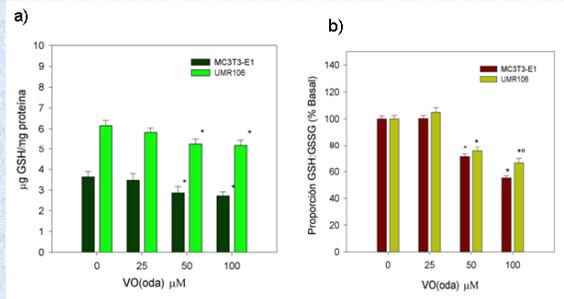
Rivadeneira J, Di Virgilio AL, Barrio DA, Muglia CI, Bruzzone L, Etcheverry SB. *Med Chem* (En prensa, 2009).

ESTRÉS OXIDATIVO Y EFECTO DE NAC SOBRE LA PROLIFERACIÓN



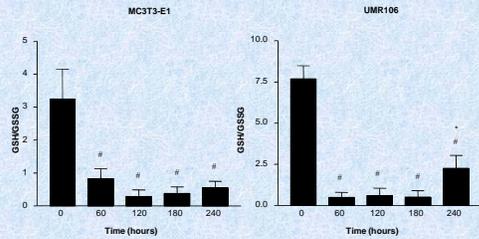
Rivadeneira J, Di Virgilio AL, Barrio DA, Muglia CI, Bruzzone L, Etcheverry SB. *Med Chem* (En prensa, 2009).

Efectos de VO(oda) sobre GSH y GSH/GSSG



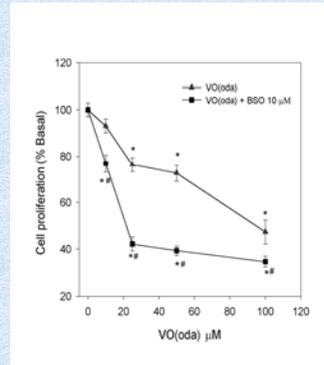
Rivadeneira J, Di Virgilio AL, Barrio DA, Muglia CI, Bruzzone L, Etcheverry SB. *Med Chem* (En prensa, 2009).

Efectos de VO(oda) sobre GSH(GSSG en función del tiempo



Rivadeneira J, Di Virgilio AL, Barrio DA, Muglia CI, Bruzzone L, Etcheverry SB. *Med Chem* (En prensa, 2009).

Efecto de BSO sobre la toxicidad de VO(oda) en MC3T3-E1

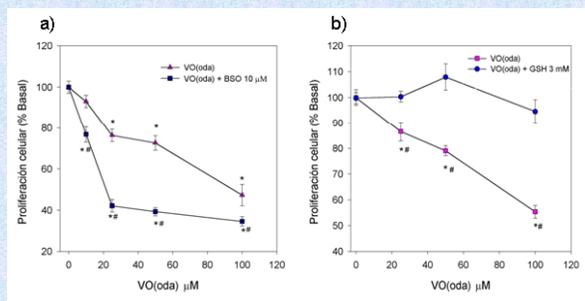


Depleción de GSH

BSO : buthionie sulfoximine

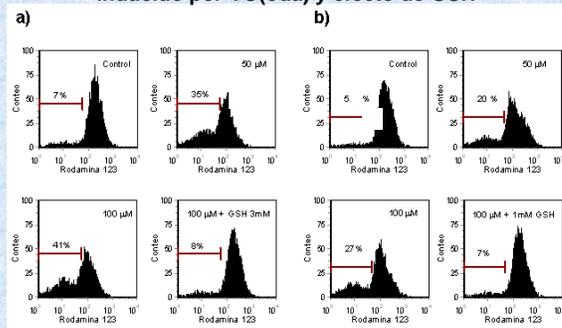
Rivadeneira J, Di Virgilio AL, Barrio DA, Muglia CI, Bruzzone L, Etcheverry SB. *Med Chem* (En prensa, 2009).

Efectos de GSH sobre la viabilidad celular en presencia de VO(oda)



Rivadeneira J, Di Virgilio AL, Barrio DA, Muglia CI, Bruzzone L, Etcheverry SB. *Med Chem* (En prensa, 2009).

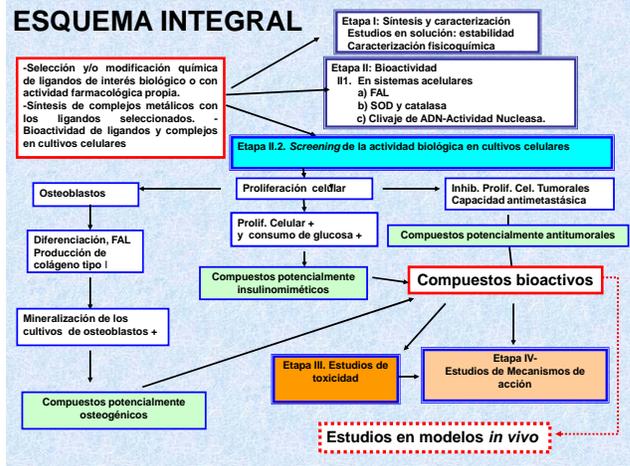
Alteración del potencial de membrana mitocondrial inducido por VO(oda) y efecto de GSH



Rivadeneira J, Di Virgilio AL, Barrio DA, Muglia CI, Bruzzone L, Etcheverry SB. *Med Chem* (En prensa, 2009).

CONCLUSIONES DE ESTUDIOS *IN VITRO* SOBRE PROPIEDADES ANTITUMORALES DE COMPUESTOS DE VANADIO

Diversos compuestos de vanadio ejercen efectos potencialmente antitumorales en células en cultivo a través de variados mecanismos de acción tales como la inducción sostenida de la vía de las ERKs y el estrés oxidativo que a su vez altera el status redox celular y lleva a la muerte de las células tumorales por alteración del citoesqueleto, alteración del metabolismo de diferentes organelas y alteración del potencial de membrana mitocondrial. Además cabe esperar Inhibición de kinasas de ciclinas e inducción de p53 que llevan a la muerte por apoptosis o necrosis.



Dr Enrique J. Baran (CEQUINOR, UNLP)
Dra. Patricia A.M. Williams (CEQUINOR, UNLP)
Dra. Evelina G. Ferrer (CEQUINOR, UNLP)
Dr. Reynaldo Pis Diez (CEQUINOR, UNLP)
Dra. Liliana Bruzzone (Qca. Analítica, UNLP)
Dra. Ana M. Cortizo (Bioq. Patol., UNLP)
Dra. Cecilia I. Muglia (Bioq. Patol., UNLP)
Dra. Ana Laura Di Virgilio (Bioq., Patol. UNLP)

Dr. Miguel A. Reigosa (IMBICE, UNLP)
Dr. Juan Zinczuk (IQUIR, UNR)

Tesis Aprobadas

Dra. Gloria E. Tobón Zapata
Dra. Viviana C. Sálice
Dr. Daniel A. Barrio
Dra. María S. Molinuevo
Dra. Josefina Rivadeneira



Muchas gracias !

