

**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**

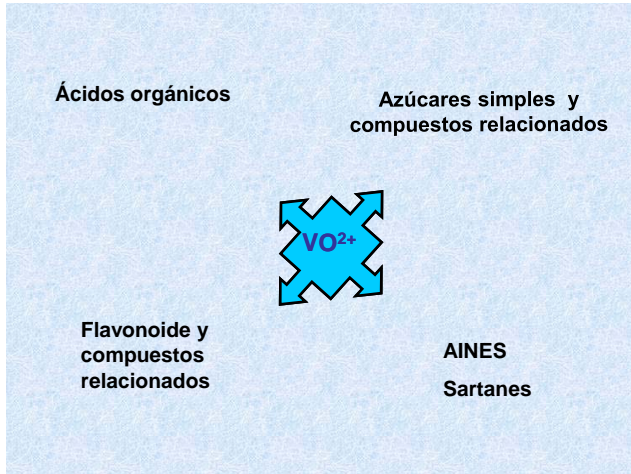
**Esquema de actividades**

-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

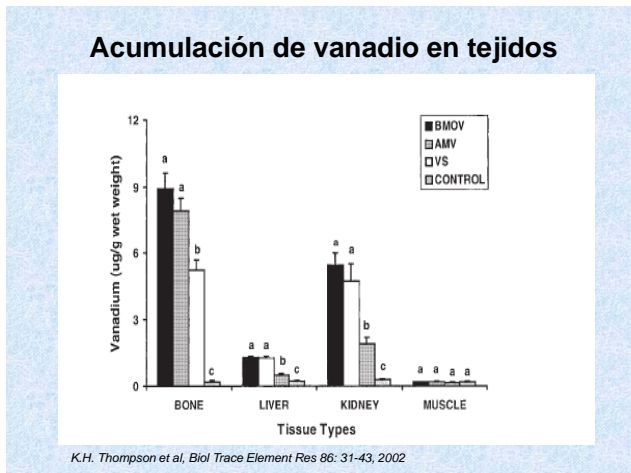
**Etapa II**  
Bioactividad  
II1. En sistemas acelulares  
a) FAL  
b) SOD y catalasa  
c) Clivaje de ADN-Actividad Nucleasa.

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



## ALMACENAMIENTO DEL VANADIO EN VERTEBRADOS

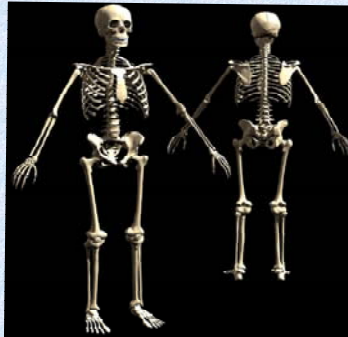
**Hígado** 1 - 3 µg/g  
**Riñón** 2,1 - 5,2 µg/g  
**Tejido óseo** 10 - 26 µg/g



## 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

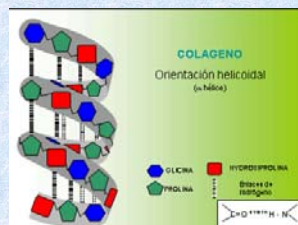
- Hidroxiapatita (Fosfato y cálcico)
- Citrato
- Bicarbonato
- Fluoruro
- Magnesio
- Sodio

### Células

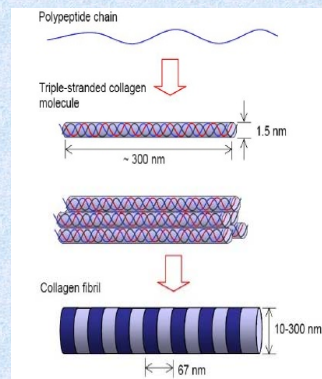
- Osteoblastos
- Osteocitos
- Osteoclastos

## MATRIZ EXTRACELULAR

### COLÁGENO

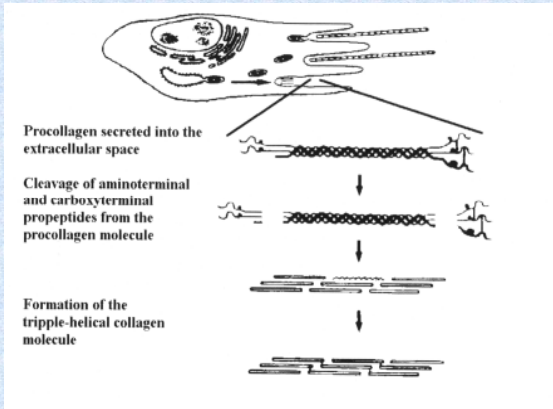


## Estructura del colágeno tipo I



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

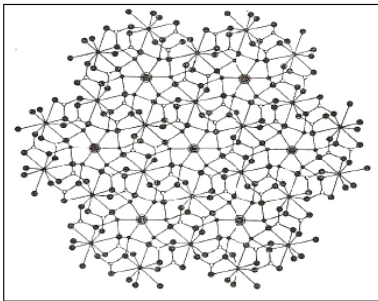


“Esto es una “fuga” y como pueden ver, es similar a la estructura del colágeno tipo I !!”

J.S.Bach

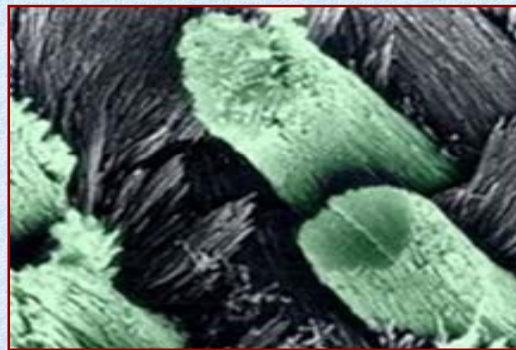


### FASE MINERAL INORGÁNICA DEL HUESO Estructura de la Hidroxiapatita



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**

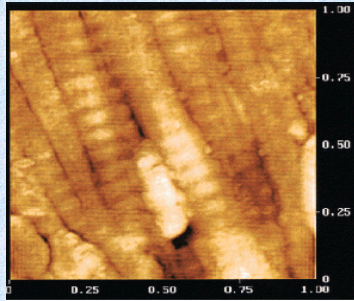
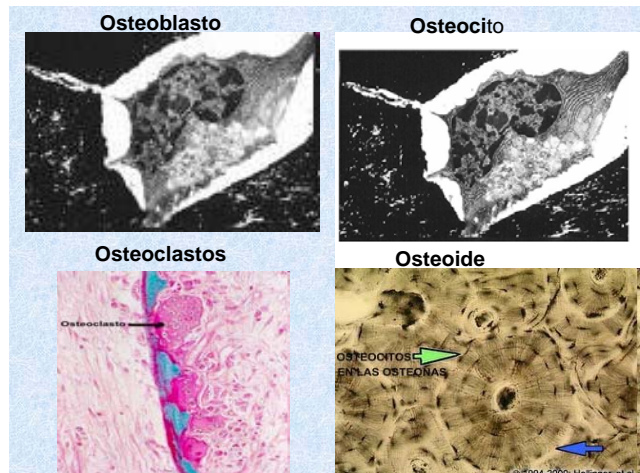
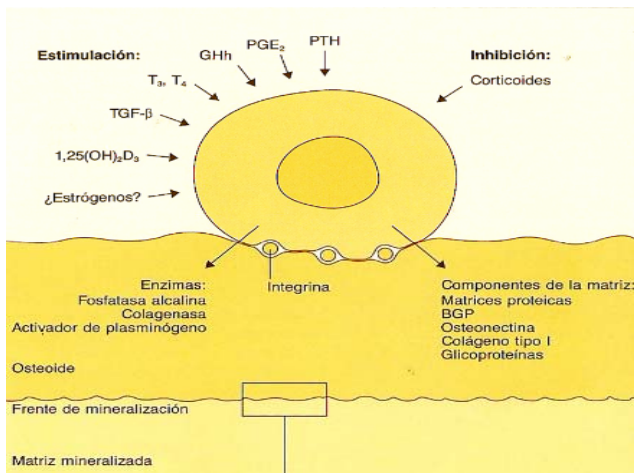
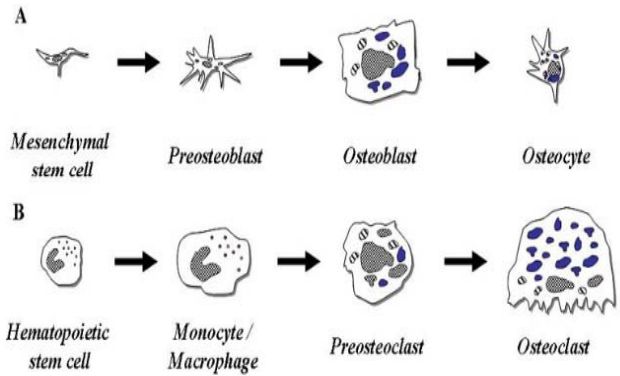


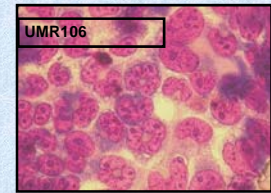
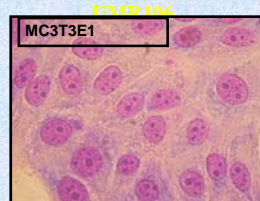
Imagen de alta resolución de 1micrón cuadrado por AFM donde se observan las fibras de colágeno y un cristal de hidroxiapatita

**Formación de osteoblastos y osteoclastos**



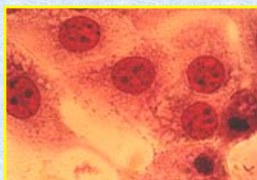
**Actividad osteogénica de los compuestos de vanadio en cultivos de osteoblastos**

**LÍNEAS OSTEoblÁSTICAS**



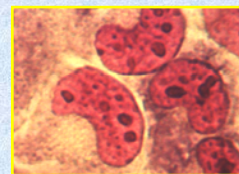
Línea celular MC3T3-E1 obtenida de calvaria de ratón

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

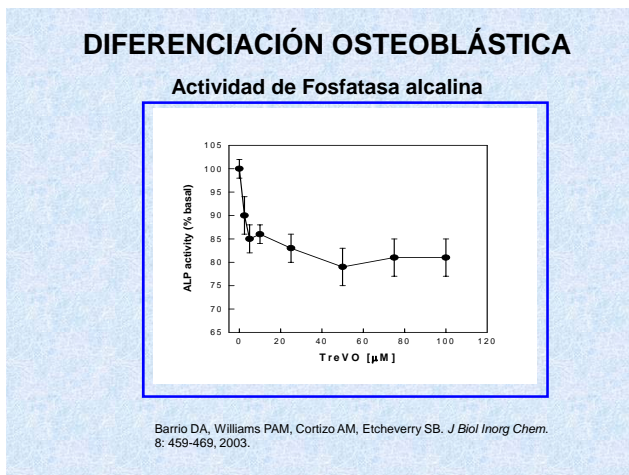
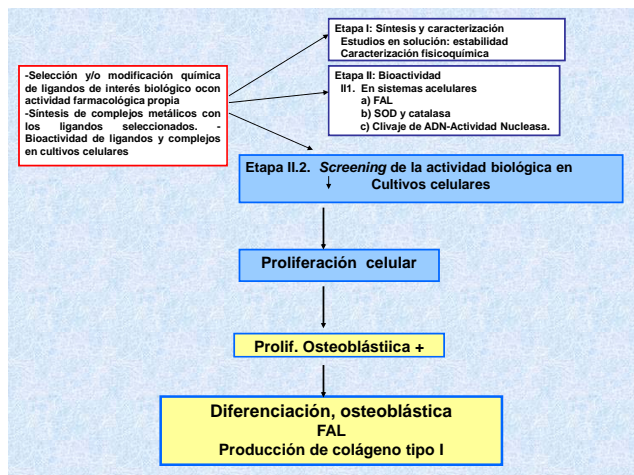
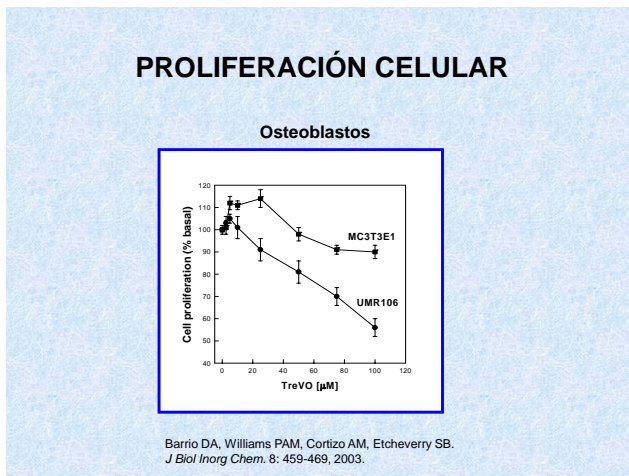
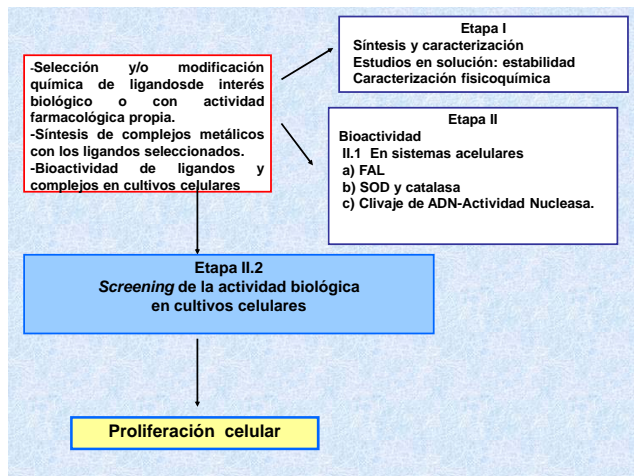


Crecen en monocapa  
Los niveles de FAL aumentan con la diferenciación  
Inhibición por contacto

Línea celular UMR106 obtenida de osteosarcoma de rata

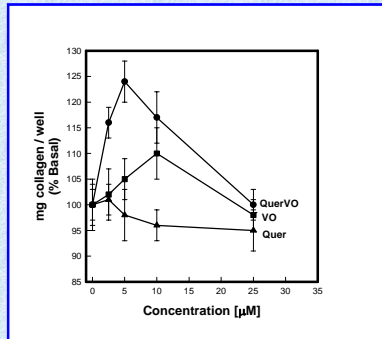


- Expresan marcadores de fenotipo osteoblástico diferenciado (FAL ósea, colágeno tipo I)
- No mineralizan la matriz secretada
- Alta tasa de replicación

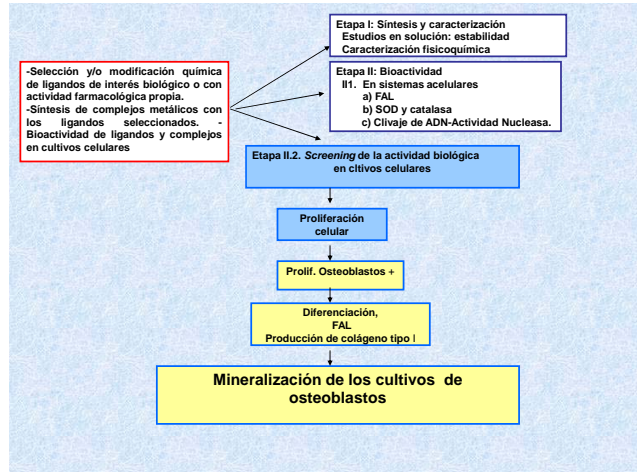


## DIFERENCIACIÓN OSTEOBLÁSTICA

### Producción de colágeno tipo I

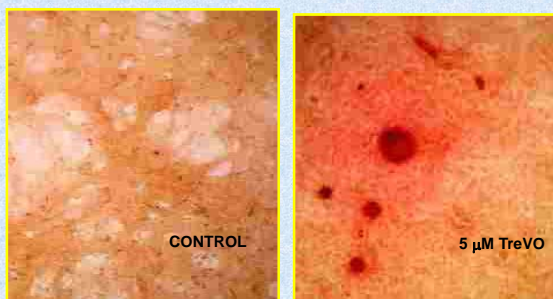


FerrerEG, Salinas MV, Correa MJ, Naso L, Barrio DA, Etcheverry SB, Lezama L, Rojo T, Williams PAM. *J Biol Inorg Chem* 11: 791-801, 2006

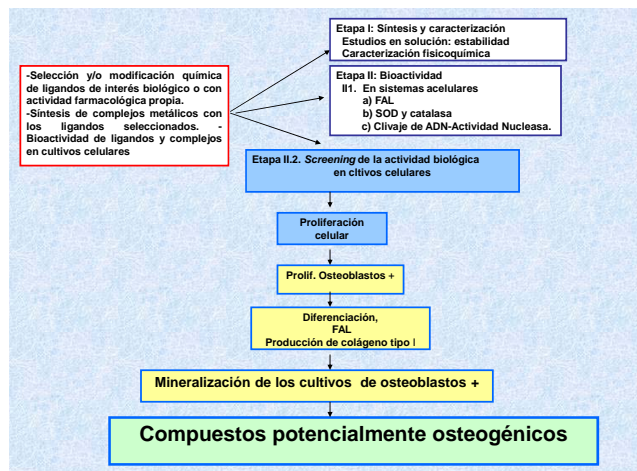


## MINERALIZACIÓN DE LA MEC

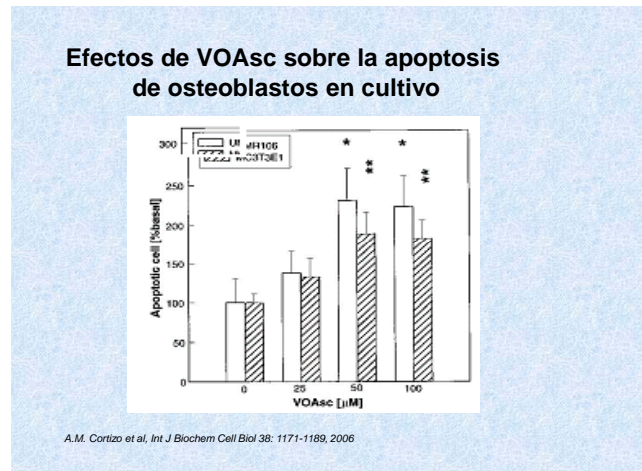
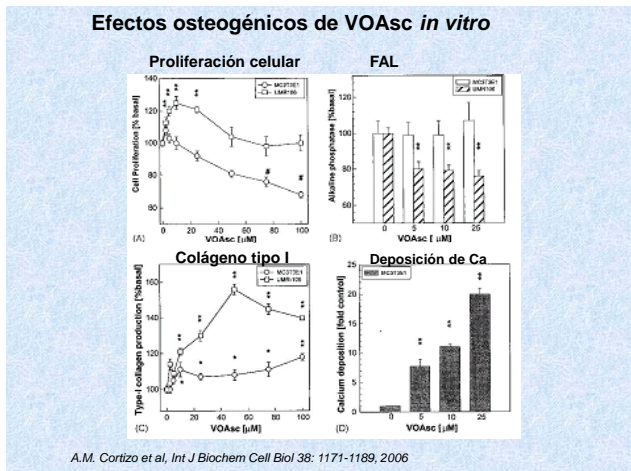
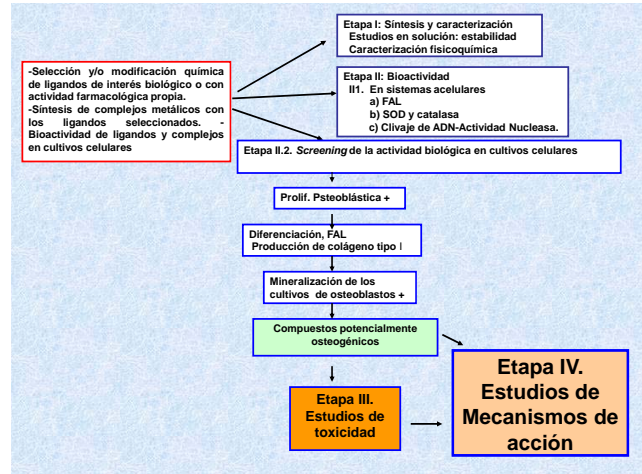
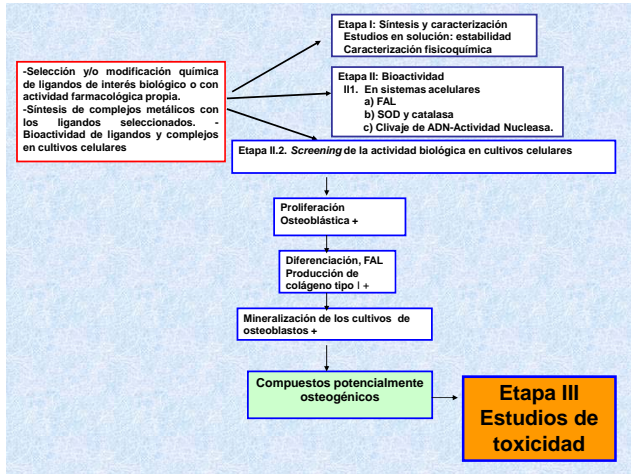
### Células MC3T3-E1



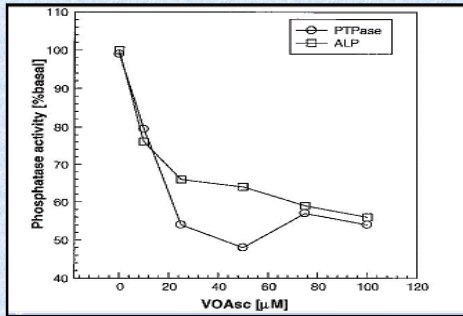
Vanadium and bone. Relevance of vanadium compounds in bone cells Etcheverry SB and Barrio DA- En: Vanadium: The versatile element. Kustin K, Costa Pessoa J and Crans DC (Ed.s). American Chemical Society Series 974. Vol 15: 204-216, 2007





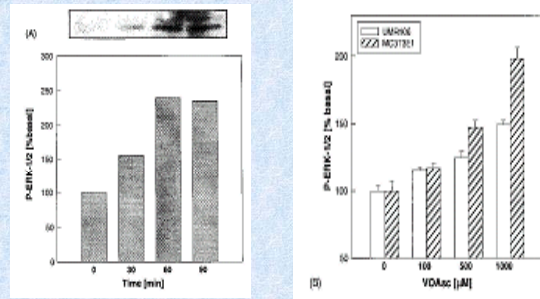


**Efectos de VOAsc sobre la actividad de fosfatasas**



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**

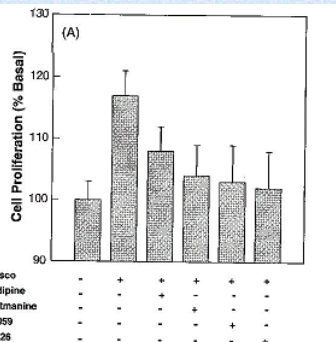


A.M. Cortizo et al, Int J Biochem Cell Biol 38: 1171-1189, 2006

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

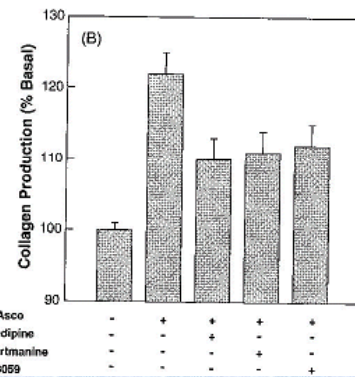
Los inhibidores de la vía de las MAPK inhibieron parcialmente la proliferación osteoblástica estimulada por VOAsc

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

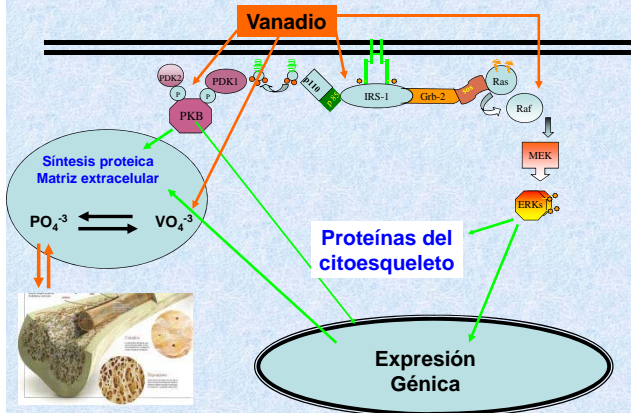


A.M. Cortizo et al, Int J Biochem Cell Biol 38: 1171-1189, 2006

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



**Acción osteogénica de compuestos de vanadio:  
Transducción de señales e intercambio aniónico**

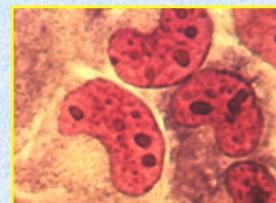


**Conclusiones de los resultados sobre  
efectos osteogénicos de compuestos de  
vanadio en cultivos de  
osteoblastos**

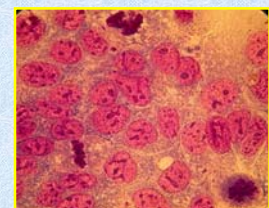
Algunos compuestos de vanadilo con diversos ligandos orgánicos mostraron poseer potenciales efectos osteogénicos *in vitro* promoviendo la síntesis de colágeno y la mineralización de la matriz ósea.

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**

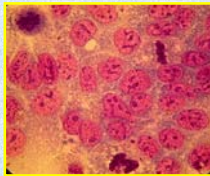


UMR106 : células inmortalizadas derivadas de un osteosarcoma de rata



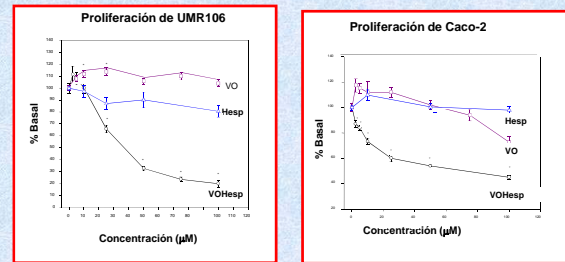
Caco-2 : células inmortalizadas derivadas de un carcinoma de colon humano

**Línea celular Caco-2 obtenida de adenocarcinoma de colon humano**



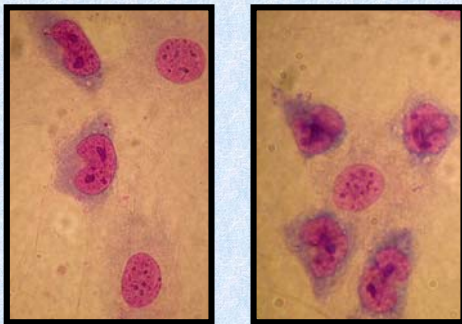
- Crecen agrupadas
- Alta tasa de replicación
- La diferenciación ocurre en aprox. 15 días de cultivo

**EFEECTO ANTIPROLIFERTIVO DE COMPUESTOS DE VANADIO EN CÉLULAS TUMORALES EN CULTIVO**



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

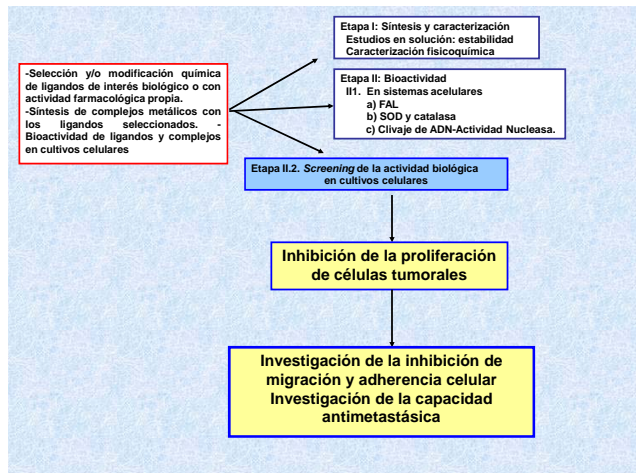
**Citotoxicidad diferencial en cultivos de osteoblastos de un compuesto de vanadio con potencial actividad antitumoral**



CONTROL

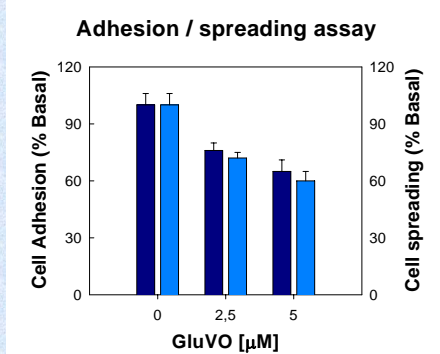
10 μM V-Salsem

Rivadeneira J. Tesis doctoral, 2009



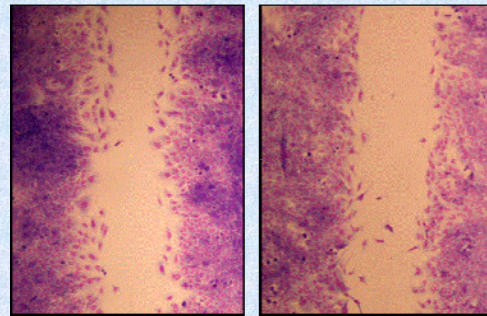


**EFFECTOS DEL VANADIO SOBRE LA MIGRACIÓN Y EL SPREADING DE CÉLULAS TUMORALES**



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

**ENSAYO DE LA HERIDA**

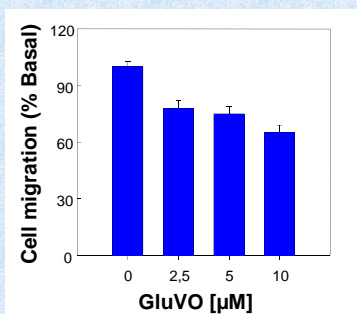


**Control**

**5  $\mu\text{M}$  GluVO**

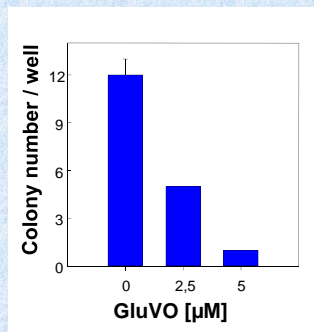
Molinuevo MS, Cortizo AM, Etcheverry SB, 5th International Vanadium Symposium, USA, 2006

**MIGRACIÓN CELULAR DESDE LA HERIDA**

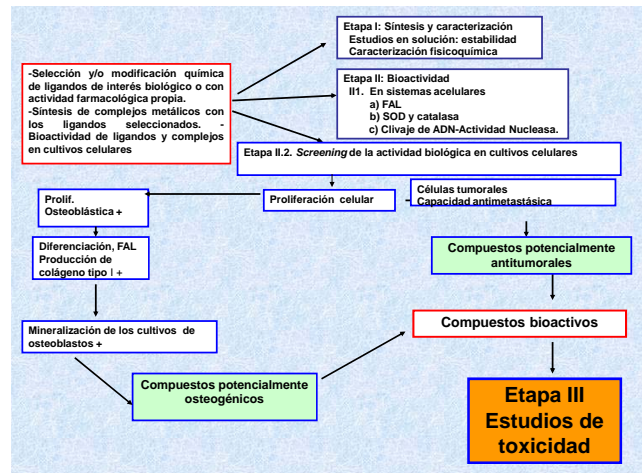
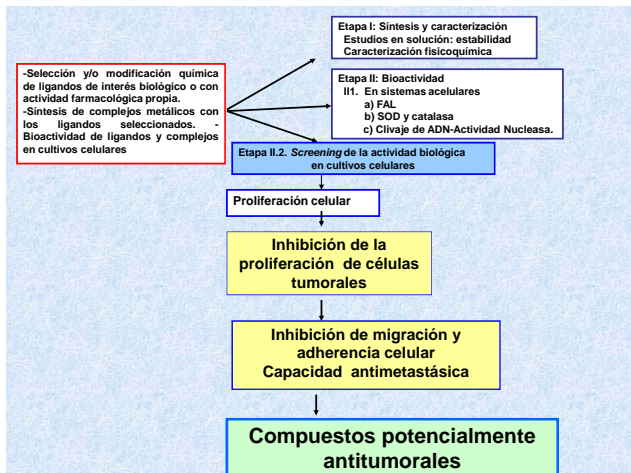
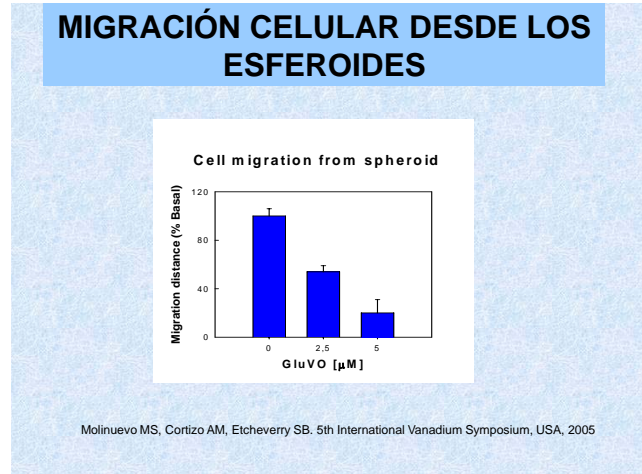
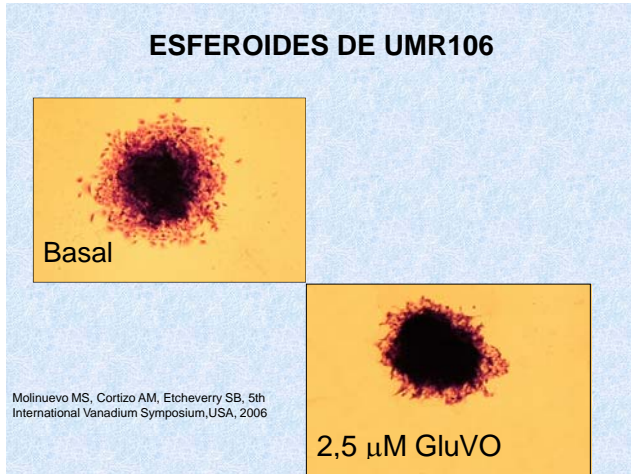


Molinuevo, MS, Cortizo AM, Etcheverry SB. *Cancer Chemother Pharmacol* 61:767-73, 2008

**CLONOGENICIDAD**



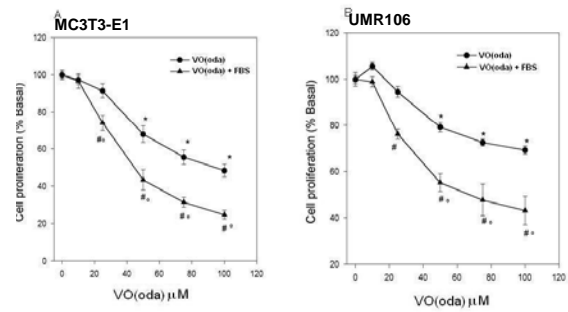
Molinuevo, MS, Cortizo AM, Etcheverry SB. *Cancer Chemother Pharmacol* 61:767-73, 2008



## ESTUDIOS DE TOXICIDAD

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

## REVERSIBILIDAD DE EFECTOS TÓXICOS



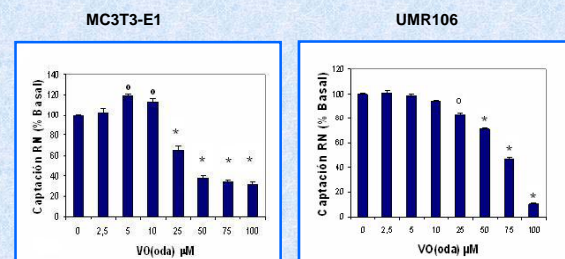
Iñeira J, Di Virgilio AL, Barrio DA, Muglia CI, Bruzzone L, Etcheverry SB. *Med Chem Res*. 2009).

## Viabilidad celular

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

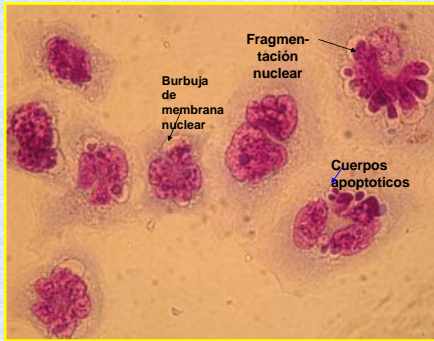
## VIABILIDAD CELULAR

Ensayo del Rojo neutro



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

## ALTERACIONES MORFOLÓGICAS

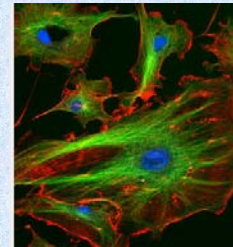


Etcheverry SB, Ferrer EG, Naso L, Rivadeneira J, Salinas V, Williams PAM. *J Biol Inorg Chem* 13: 435-447, 2008

## CITOESQUELETO

### COMPONENTES

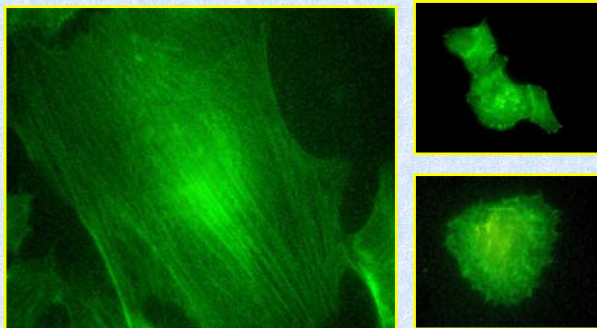
Microfilamentos  
Filamentos intermedios  
Microtúbulos



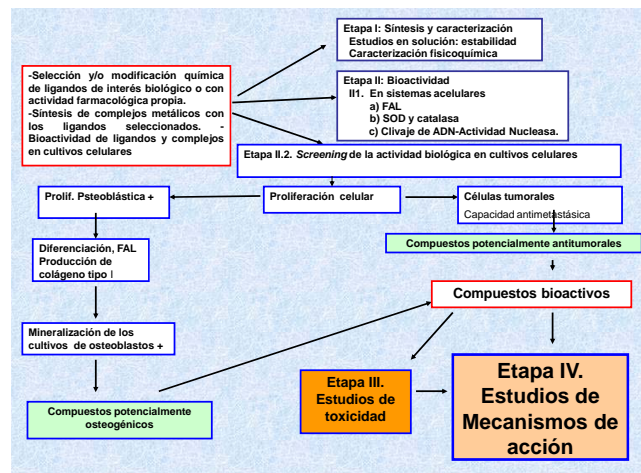
### FUNCIONES

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).





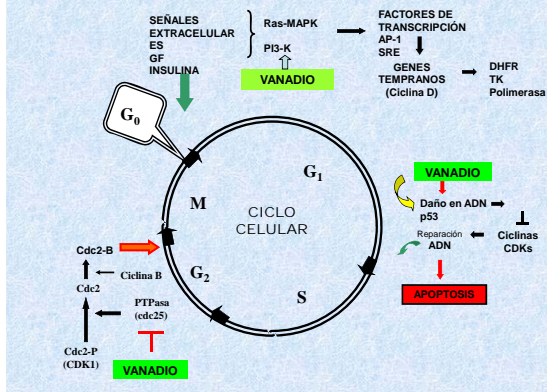
## MECANISMOS DE ACCIÓN

Activación de la vía de las ERKs

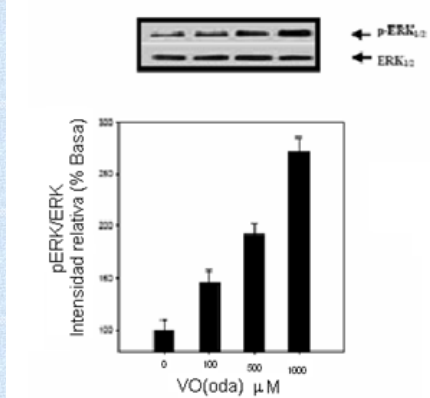
Estrés oxidativo y status redox celular

Apoptosis

## Consecuencias de la inhibición de PTPasas

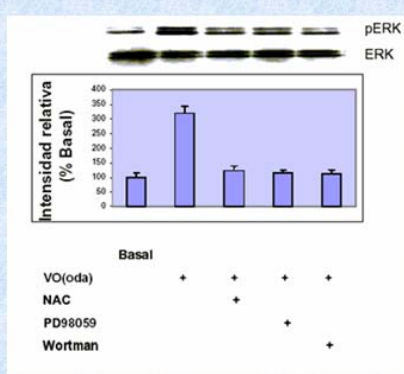


## Activación de las ERKs por VO(oda) en osteoblastos



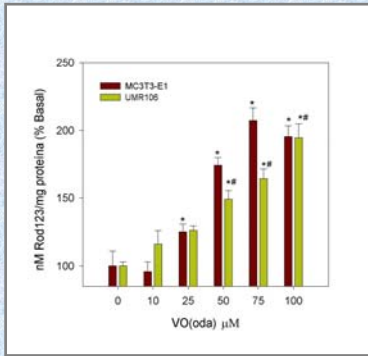
Rivadeneira J, Di Virgilio AL, Barrio DA, Muglia CI, Bruzzone L, Etcheverry SB. *Med Chem* (En prensa, 2009).

## 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)



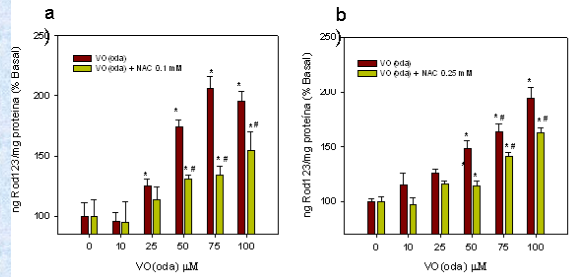
Rivadeneira J, Di Virgilio AL, Barrio DA, Muglia CI, Bruzzone L, Etcheverry SB. *Med Chem* (En prensa, 2009).

### ESTRÉS OXIDATIVO Y STATUS REDOX CELULAR

Efecto de NAC

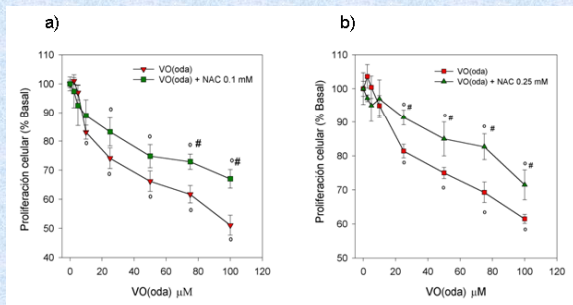
MC3T3-E1

UMR106



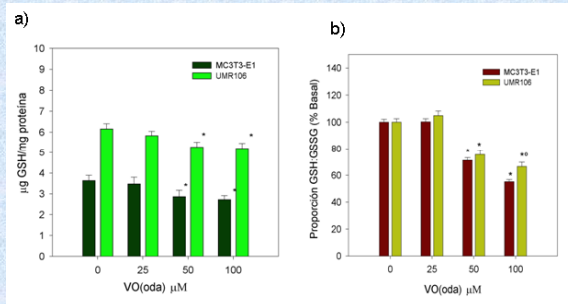
Rivadeneira J, Di Virgilio AL, Barrio DA, Muglia CI, Bruzzone L, Etcheverry SB. *Med Chem* (En prensa, 2009).

### ESTRÉS OXIDATIVO Y EFECTO DE NAC SOBRE LA PROLIFERACIÓN



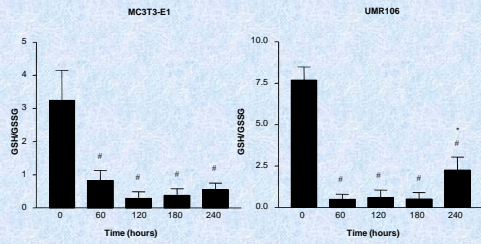
Rivadeneira J, Di Virgilio AL, Barrio DA, Muglia CI, Bruzzone L, Etcheverry SB. *Med Chem* (En prensa, 2009).

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



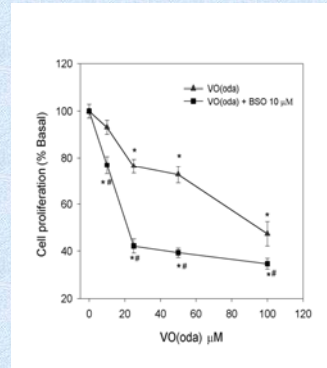
Rivadeneira J, Di Virgilio AL, Barrio DA, Muglia CI, Bruzzone L, Etcheverry SB. *Med Chem* (En prensa, 2009).

### 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

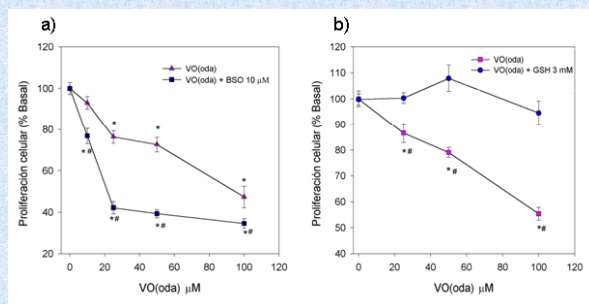


Depleción de GSH

BSO : buthionie sulfoximine

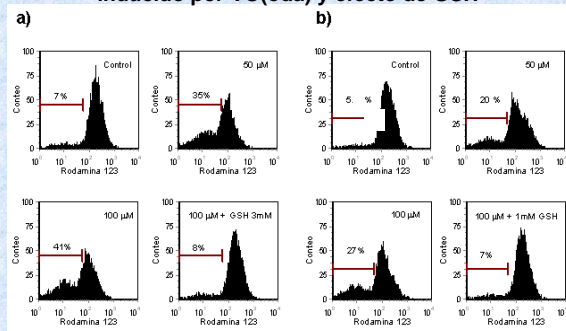
Rivadeneira J, Di Virgilio AL, Barrio DA, Muglia CI, Bruzzone L, Etcheverry SB. *Med Chem* (En prensa, 2009).

### 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).

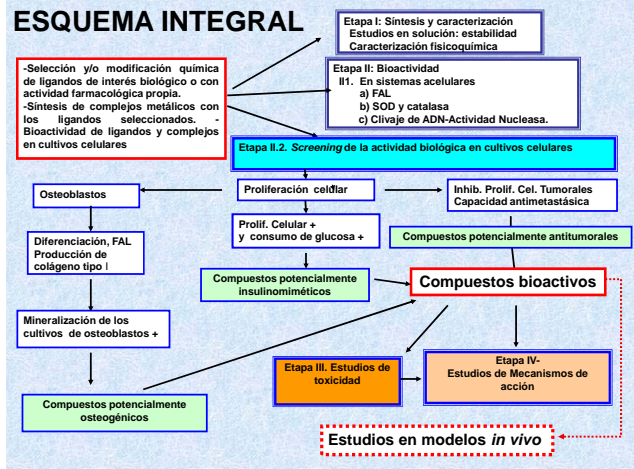
### Alteración del potencial de membrana mitocondrial inducido por VO(oda) y efecto de GSH



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. Sálce  
Dr. Daniel A. Barrio  
Dra. María S. Molinuevo  
Dra. Josefina Rivadeneira



**Muchas gracias !**

