

Grado en Biología

Memoria del Trabajo de Fin de Grado

**Análisis preliminar del potencial biomédico de receptores
macrocíclicos orgánicos con respuesta a estímulos II**

**Análise preliminar do potencial biomédico de receptores
macrocíclicos orgánicos con resposta a estímulos II**

**Preliminary screening of stimuli-responsive organic
macrocyclic receptors for biomedical applications II**

Natalia Fernández Labandeira

Curso: 2020 - 2021

Convocatoria: Julio

Directores:

Ana Rey Rico

Andrés Martínez Lage

TRABAJO DE FIN DE GRADO

D.^a Ana Rey Rico y D. Andrés Martínez Lage autorizan la presentación del Trabajo de Fin de Grado “Análisis preliminar del potencial biomédico de receptores macrocíclicos orgánicos con respuesta a estímulos II” presentado por Natalia Fernández Labandeira para su defensa ante el tribunal cualificador.

A handwritten signature in black ink on a light beige background. The signature is written in a cursive style and reads "Ana Rey".

Asdo: Ana Rey Rico

A handwritten signature in blue ink on a light beige background. The signature is written in a cursive style and reads "Andrés Martínez Lage".

Asdo: Andrés Martínez Lage

AGRADECIMIENTOS

Quisiera dar las gracias a mis tutores, Dra. Ana Rey Rico y D. Andrés Martínez Lage, por permitirme participar en este proyecto tan interesante. En especial, gracias a Ana, por su ayuda, apoyo y por estar a mi lado en todo momento.

Gracias a Natalia, por su ayuda en el laboratorio y por sus consejos.

Gracias a mis amigos de Simultaneidad, por todo lo que hemos vivido juntos estos últimos seis años.

Por último, gracias a mi familia, por todo.

ABREVIATURAS, SÍMBOLOS Y ACRÓNIMOS

Abs	Absorbancia
BCA	<i>Bicinchoninic acid</i> (Ácido bicincóninico)
BSA	<i>Bovine serum albumin</i> (Seroalbúmina bovina)
C ⁻	Control negativo
HPLC	High Performance Liquid Chromatography (Cromatografía Líquida de Alta Eficacia)
INT	<i>Iodo-Nitro-Tetrazolium salt [2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-phenyltetrazolium chloride]</i>
λ	Longitud de onda
DMSO	Dimetilsulfóxido
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i> (Ácido etilendiaminotetraacético)
ISO	<i>International Organization for Standardization</i> (Organización Internacional de Normalización)
LDH	Lactato deshidrogenasa
MIMs	Mechanically Interlocked Molecules (Moléculas mecánicamente entrelazadas)
NAD ⁺ /NADH	<i>Nicotinamide Adenine Dinucleotide</i> (Nicotinamida adenina dinucleótido)
MEM	<i>Minimum Essential Media</i> (Medio esencial mínimo)
P/E	Penicilina/Estreptomina
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> (tampón fosfato salino)
SD	<i>Standard Deviation</i> (Desviación estándar)
SFB	Suero Fetal Bovino
WST-1	<i>Water-Soluble-Tetrazolium salt [2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium sodium salt]</i>

RESUMEN

En la actualidad, el autoensamblaje de moléculas a través de interacciones covalentes se ha postulado como una herramienta de gran utilidad para la síntesis de nuevos receptores moleculares, que son de gran interés en biomedicina por su versatilidad y múltiples aplicaciones. Específicamente, los complejos *host-guest* resultan especialmente interesantes, ya que pueden responder a estímulos externos como cambios en el medio celular externo y ser modulados para su utilización como sistemas de liberación controlada de fármacos. Entre estos compuestos, destaca el macrociclo *red box* cuya capacidad aceptora puede ser modulada mediante reacciones redox y cambios de pH, con el fin de maximizar su potencial como vehículo de liberación controlada de fármacos en aplicaciones biomédicas.

Como primer paso para evaluar el potencial de la *red box* como sistema de liberación de fármacos, en el presente estudio se evaluó su biocompatibilidad mediante la realización de ensayos biológicos basados en medidas de la viabilidad celular y citotoxicidad en una línea celular normal (HFF-1) y otra tumoral (HeLa). Además, para confirmar que el macrociclo es capaz de atravesar la membrana plasmática, se llevó a cabo un estudio de internalización celular. Los resultados mostraron que la *red box* afectó en mayor medida a la viabilidad y proliferación celular de la línea no tumoral, lo cual podría estar relacionado con la mayor velocidad de división de las células cancerosas y/o una mayor permeabilidad al compuesto de la línea no tumoral. Asimismo, el estudio preliminar de internalización celular en células HeLa reveló la entrada de un pequeño porcentaje de *red box* en el interior de las células siendo mayor a las 24 h de exposición.

PALABRAS CLAVE

Química supramolecular, complejo de inclusión, *host-guest*, iminas, macrociclo, citocompatibilidad, viabilidad celular, internalización celular, proliferación celular, citotoxicidad, liberación controlada de fármacos

RESUMO

Na actualidade, a autoensamblaxe de moléculas a través de interaccións covalentes postulouse como unha ferramenta de gran utilidade para a síntese de novos receptores moleculares, que son de gran interese en biomedicina pola súa versatilidade e múltiples aplicacións. Especificamente, os complexos *host-guest* resultan especialmente interesantes, xa que poden responder a estímulos externos, coma cambios no medio celular externo e ser modulados para a súa utilización como sistemas de liberación controlada de fármacos. Entre estes compostos, destaca o macrociclo *red box* cuxa capacidade aceptora pode ser modulada mediante reaccións redox e cambios de pH, co fin de maximizar o seu potencial como vehículo de liberación controlada de fármacos en aplicacións biomédicas.

Como primeiro paso para avaliar o potencial da *red box* como sistema de liberación de fármacos, no presente estudo avaliouuse a súa biocompatibilidade mediante a realización de ensaios biolóxicos baseados en medidas da viabilidade celular e citotoxicidade nunha liña celular normal (HFF-1) e outra tumoral (HeLa). Ademais, para confirmar que o macrociclo é capaz de atravesar a membrana plasmática, levouse a cabo un estudo de internalización celular. Os resultados mostraron que a *red box* afectou en maior medida á viabilidade e proliferación celular da liña non tumoral, o cal podería estar relacionado coa maior velocidade de división das células cancerosas e/ou unha maior permeabilidade ao composto da liña non tumoral. Así mesmo, o estudo preliminar de internalización celular en células HeLa revelou a entrada dun pequeno porcentaxe de *red box* no interior das células sendo maior ás 24 h de exposición.

PALABRAS CHAVE

Química supramolecular, complexo de inclusión, *host-guest*, iminas, macrociclo, citocompatibilidade, viabilidade celular, internalización celular, proliferación celular, citotoxicidade, liberación controlada de fármacos

ABSTRACT

Nowadays, self-assembly of molecules through covalent interactions has been postulated as a very useful tool for the synthesis of new molecular receptors, being of great interest in biomedicine due to their versatility and multiple applications. Specifically, host-guest complexes are especially interesting, since they can respond to external stimuli as those from the external cellular environment and be modulated for their use as controlled drug delivery systems. Among these compounds, the macrocycle *red box*, whose acceptor capacity can be modulated by redox reactions and changes in pH to maximize its potential as a vehicle for controlled drug delivery in biomedical applications, is of great interest.

As a first step to evaluate its potential as a drug delivery system, in the present study the biocompatibility of *red box* was evaluated by conducting biological assays based on measurements of cell viability and cytotoxicity in a normal cell (HFF-1) and in a tumor cell (HeLa) lines. Furthermore, to confirm the macrocycle capability to cross the cell membrane, a cell internalization study was carried out. The results showed that the *red box* affected the cell viability and proliferation of the non-tumor line to a greater extent, which could be related to the higher division rate of cancer cells and/or the major permeability to the compound of the non-tumor line. Likewise, the preliminary study of cellular internalization in HeLa cells revealed the entry of a small percentage of *red box* inside the cells, being higher after 24 h of exposure.

KEYWORDS

Supramolecular chemistry, inclusion complex, *host-guest*, imines, macrocycle, cytocompatibility, cell viability, cellular internalization, cell proliferation, cytotoxicity, controlled drug delivery.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
1. El enlace hidrazona en sistemas de liberación controlada de fármacos	1
2. El macrociclo <i>red box</i>	2
3. Estudio de la biocompatibilidad de la <i>red box</i>	3
OBJETIVO	5
PROCEDIMIENTOS GENERALES	5
1. Cultivos celulares	5
1.1. Líneas celulares ensayadas: HeLa y HFF-1	5
1.2. Medios y condiciones de cultivo.....	6
1.3. Descongelación de las líneas celulares	6
1.4. Pases celulares.....	6
2. Estudios de citocompatibilidad	7
2.1. Preparación de las disoluciones de <i>red box</i>	7
2.2. Siembra de HFF-1 y HeLa en placa.....	8
2.3. Incubación de las células con disoluciones de <i>red box</i>	8
2.4. Ensayos celulares	8
2.4.1. Ensayo WST-1	9
2.4.1.1. Procedimiento del ensayo WST-1	10
2.4.2. Ensayo LDH	10
2.4.2.1. Procedimiento del ensayo LDH.....	11
2.4.3. Ensayo BCA	11
2.4.3.1. Procedimiento del lisado para el ensayo BCA.....	12
2.4.3.2. Procedimiento del ensayo BCA.....	12
2.4.4. Medida de la absorbancia de <i>red box</i> en el medio de cultivo.....	12
2.5. Análisis de datos	13
RESULTADOS	13
1. Ensayos de citocompatibilidad.....	13
2. Estudio indirecto de la internalización de <i>red box</i> en células HeLa	15
DISCUSIÓN	16
CONCLUSIONES	20
CONCLUSIÓNS	20
CONCLUSIONS	21

INTRODUCCIÓN

1. El enlace hidrazona en sistemas de liberación controlada de fármacos

En biología, es común el uso de interruptores y máquinas químicamente sensibles para regular el plegamiento de proteínas, la entrada y translocación viral, la creación de gradientes de protones y el transporte de fármacos (Harris et al., 2018). Muchos de estos compuestos son complejos *host-guest* (unión de un receptor y un sustrato) que sufren cambios conformacionales, configuracionales o de traslación reversibles, modulados mediante irradiación, metalación, cambios de temperatura o pH (Tatum et al., 2014). Específicamente, los sistemas sensibles al pH del medio permiten la liberación controlada de los fármacos que albergan mediante un cambio estructural (Tian et al., 2020). La vectorización de fármacos es el método o proceso de transporte de un compuesto farmacéutico hasta su sitio específico de acción para conseguir un efecto terapéutico deseado en humanos o animales. Estos sistemas se utilizan por ejemplo en la administración de fármacos por vía parenteral para prevenir problemas de inmunogenicidad, u oral para evitar problemas derivados del pH estomacal y la rápida degradación enzimática en el tracto gastrointestinal, mediante el uso de liposomas, microesferas, geles o ciclodextrinas (Tiwari et al., 2012). Los sistemas de liberación controlada permiten además aumentar la solubilidad, permeabilidad celular y estabilidad del fármaco que transportan (Blanco et al., 1991), a la vez que reducen su toxicidad local y sistémica; ya que pueden ser dirigidos a células o tejidos concretos al introducir alguna unidad de reconocimiento en su estructura como ligandos, péptidos o ácidos nucleicos (Zhang & Ma, 2013). De este modo, a través de su vehiculización se consigue disminuir los posibles efectos adversos de los fármacos sin modificar las propiedades de sus principios activos (Tian et al., 2020)

Recientemente, se han estudiado sistemas conteniendo diferentes grupos químicos, como los acetales, ortoésteres, aminas e hidrazonas sensibles a las condiciones de pH ácido de las células tumorales o de las zonas de infección (Sonawane et al., 2017). Así, las hidrazonas ($R_1R_2=NNHR_3$) han sido ampliamente estudiadas como base de estas supramoléculas porque son compuestos modulables, estables, con elevada diversidad funcional y de síntesis directa (Verma et al., 2014), gracias al autoensamblaje de moléculas mediante interacciones covalentes y otras fuerzas intermoleculares débiles (Steed & Atwood, 2000). Las moléculas formadas por enlaces covalentes dinámicos poseen ciertas propiedades de gran interés en biomedicina, como son la reversibilidad del enlace covalente, capacidad de respuesta dinámica a estímulos físico-químicos, auto-ensamblaje adaptativo y biodegradabilidad. De este modo, los complejos *host-guest* pueden adaptarse a los ambientes biológicos y a alteraciones en el medio externo (Ma & Zhao, 2015). Además, las hidrazonas exhiben una reactividad análoga a las iminas, aunque son más estables en

agua, hasta el punto que son consideradas inertes en condiciones neutras y en agua pura. La presencia del enlace imina permite que estos compuestos puedan sufrir isomerización activada por la luz o por el pH, puesto que el α -hidrógeno de las hidrazonas es más ácido que el de las cetonas (Tatum et al., 2014). Se ha demostrado que los derivados de hidrazonas o su combinación con otros grupos funcionales muestran propiedades farmacológicas de interés como antimicrobianas, analgésicas, antiinflamatorias, anticancerígenas, antifúngicas, antivirales, antiplaquetarias o cardioprotectoras (Verma et al., 2014).

2. El macrociclo *red box*

El ciclofano ciclobis(paraquat-p-fenileno) o *blue box* y sus derivados son una de las familias más empleadas en la síntesis de MIMs (*Mechanically Interlocked Molecules*), como los catenanos y los rotaxanos (Dale et al., 2016). Este macrociclo está formado por dos unidades de 4,4'-bipiridinio π -deficientes unidas mediante dos unidades de p-xileno, formando una estructura “tipo caja”. En su interior, presenta una cavidad hidrofóbica rígida que puede alojar sustratos π -excedentes de tamaño y complementariedad adecuada, tanto en medio acuoso como en medio orgánico (Odell et al., 1988). Los complejos formados mediante interacciones de tipo dador-aceptor se ven aún más estabilizados por fuerzas de Van der Waals y por enlaces de hidrógeno, aunque se cree que las fuerzas hidrofóbicas son clave en la estabilización y solvatación de los sustratos aromáticos en el interior de la cavidad (Asakawa et al., 1996). Por otro lado, existe un equilibrio redox entre dos formas del macrociclo, por lo que se podría controlar la fuerza aceptora del ciclofano mediante reacciones redox (Bernardo et al., 1992). Por lo tanto, la *blue box* puede complejarse con diversas sustancias de interés en biología, como son los derivados de la hidroquinona, del naftaleno, del indol, fenilglucopiranosidos, aminoácidos aromáticos, y neurotransmisores, entre otros (Asakawa et al., 1996).

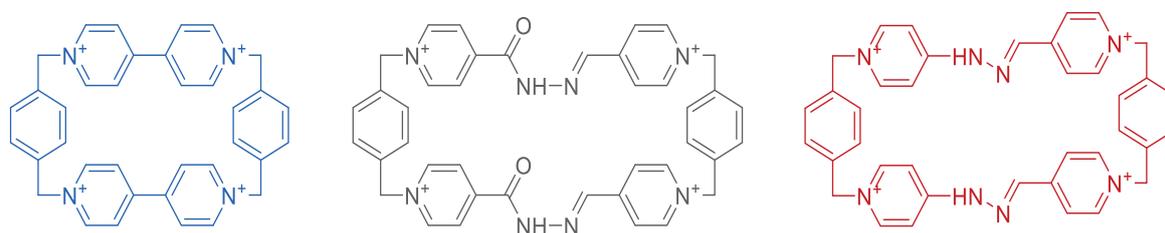


Figura 1. Estructuras de la *blue box*, *white box* y *red box*, respectivamente

En los últimos años, se han buscado nuevos análogos de la *blue box* (Figura 1), cuya síntesis sea más sencilla, más eficiente y de menor coste económico (Dale et al., 2016). En 2018, se sintetizó un análogo acil hidrazona de carácter dinámico, la *white box* (García et al., 2014). Este compuesto presenta, además, un comportamiento dual como hospedador en medio acuoso, gracias a que posee una gran sensibilidad al pH (pK_a (protones amida)=6,5).

En medio ácido, el macrociclo es conformacionalmente flexible y presenta isomería rotacional; mientras que en medio básico, dos cargas negativas se deslocalizan en los anillos de piridinio, convirtiéndose en una molécula rígida y sin isomería (Blanco-Gómez et al., 2019a).

Finalmente, en el año 2019, se sintetizó un nuevo análogo acil hidrazona, la *red box*. La eliminación de los grupos carbonilos existentes en la *white box* da lugar a un macrociclo de menor tamaño, la *red box*, con mayor capacidad π -aceptora y más estabilidad del complejo, porque existe una mayor resonancia en los anillos de piridinio sin perder estabilidad hidrolítica. También es capaz de complejar diversos sustratos en medio acuoso, tanto en su forma ácida ($pK_a=8,3$) como en su forma básica ($pK_a=7,4$). Así, este macrociclo se compleja en su forma ácida en medios orgánicos porque la forma básica presenta un menor carácter π -deficiente. Por consiguiente, la *red box* posee las características ideales para desarrollar nuevos antitumorales, usarse como vehículo para liberación de fármacos hidrofóbicos o aniónicos y en catálisis supramolecular (Blanco-Gómez et al., 2019b).

3. Estudio de la biocompatibilidad de la *red box*

Para evaluar el posible uso biomédico de un compuesto, es esencial el estudio de la biocompatibilidad del mismo. La biocompatibilidad es definida por Ratner como “la capacidad de un material para generar una reacción específica en un organismo”. Por lo tanto, las características ideales de un compuesto biocompatible son la falta de citotoxicidad, que no provoque reacciones inflamatorias o alérgicas y la biodegradabilidad. Además, deben presentar unas propiedades fisicoquímicas y estructurales que les permitan ser estables en los fluidos corporales y su posible modificación covalente permite mejorar la captación activa y pasiva (Jurak et al., 2021).

Dada la potencial aplicación de la *red box* como sistema de liberación controlada de fármacos en biomedicina resulta de gran interés el estudio inicial de su citocompatibilidad. Para la evaluación de la misma se requiere del estudio de su perfil de citotoxicidad utilizando varias concentraciones de compuesto a distintos tiempos de exposición, en líneas celulares establecidas obtenidas a partir de repositorios comerciales como la *American Type Culture Collection* (ATTC). Las células utilizadas en el presente estudio incluyeron una línea celular normal de fibroblastos (HFF-1; ATTC[®] SCRC-1041TM) y una tumoral de carcinoma de cérvix (HeLa; ATTC[®] CCL.2TM). Los fibroblastos (HFF-1) son células ampliamente utilizadas en investigación biomédica. Estas células constituyen el tipo celular más abundante de la dermis, siendo fácilmente aislables y presentado un crecimiento rápido. Entre sus aplicaciones, la línea HFF-1 se utiliza en sistemas de cocultivo con otras células, para testar la toxicidad de compuestos en células normales, y también en el estudio

de la patogenicidad de diversos microorganismos (Oliveira et al., 2018). Por otro lado, la línea celular HeLa es una de las líneas más ampliamente usadas en investigación biomédica por su versatilidad y poder de división. Desde su aislamiento en 1951 de una paciente con cáncer de cérvix, se han utilizado en números estudios algunos de los cuales supusieron importantes avances en la biología del cáncer, biología molecular y genética, las enfermedades infecciosas o la microbiología fundamental (National Institutes of Health, 2018).

Con el fin de evaluar si un compuesto afecta a la proliferación celular, es necesario realizar un ensayo de citotoxicidad. Estas pruebas de citotoxicidad *in vitro* son métodos sencillos, rentables y predictivos para caracterizar el potencial tóxico de compuestos químicos (Niles et al., 2009). Para estimar el número de células viables en un ensayo, son comunes métodos en donde se registran los datos en un lector de placas, como son la reducción de tetrazolio o la reducción de ATP. Estos miden una actividad metabólica o enzimática, que se relaciona con el número de células viables (Riss et al., 2004b). Así una reducción en la actividad de estos biomarcadores en las células tratadas con el compuesto de interés con respecto a la del control de células sin tratar, es indicativo de una disminución en la tasa de división celular normal, o de la inducción de muerte celular por mecanismos de eliminación programados como la apoptosis. Además, como se mide el número relativo de células que quedan tras el tratamiento, ofrecen una utilidad significativa incluso en tratamientos largos (72 h) con el compuesto (Niles et al., 2009).

Por otro lado, en los ensayos de citotoxicidad se hace uso de enzimas como biomarcadores, las cuales son liberadas al medio de cultivo tras la pérdida de la integridad de la membrana asociada con la muerte celular por necrosis (Cummings et al., 2004). Estas enzimas tienen una vida media finita, lo que puede limitar su utilidad durante incubaciones prolongadas de contacto con el compuesto. Entre ellos destacan el ensayo LDH y la medida de las proteasas (Niles et al., 2009). De este modo, un compuesto es considerado citotóxico si previene la adherencia celular, provoca cambios morfológicos drásticos, disminuye la tasa de replicación o reduce la viabilidad en general (Horváth, 1980). Actualmente, para la evaluación biológica y clínica de materiales médicos se toman como marco de referencia las normas ISO, estándares internacionales desarrolladas por expertos de 165 países, que garantizan al consumidor la calidad y seguridad de los productos (International Organization for Standardization, 2021). Así, para evaluar la citotoxicidad de la *red box* se hace uso de la norma ISO 10993-5: 2009 (International Standard ISO 10993-5 2009).

OBJETIVO

El macrociclo *red box* se sintetizó como parte del trabajo experimental del TFG de Química. Asimismo, se realizaron estudios de complejación del macrociclo con naproxeno y 8-metoxipsoraleno, que evidenciaron la formación del complejo y el posible uso del macrociclo como vehículo de fármacos.

Como primer paso para evaluar su posible uso como sistema de liberación controlada de fármacos en aplicaciones biomédicas, el presente Trabajo de Fin de Grado de Biología se centró en el estudio la biocompatibilidad de la *red box* en contacto con cultivos celulares. Para ello se establecieron los siguientes objetivos específicos:

- Estudiar el perfil de citotoxicidad y citocompatibilidad de la *red box* en dos líneas celulares humanas.
- Realizar un ensayo preliminar para determinar la capacidad de internalización de la *red box* en la célula.

PROCEDIMIENTOS GENERALES

1. Cultivos celulares

Todas las técnicas relativas a la manipulación de los cultivos fueron llevadas a cabo en una cabina de seguridad biológica de tipo 2 Telstar BIO-II-Advance (España), en condiciones de esterilidad, y haciendo uso de material estéril para evitar la contaminación de las células. Los volúmenes se midieron haciendo uso de pipetas serológicas estériles de 10, 25 y 50 mL, en función del volumen a medir, y pipeteador automático, con cuidado de no dañar la monocapa de células e intentando evitar la contaminación cruzada. También se intentó reducir al mínimo el tiempo de exposición al ambiente de las muestras, reactivos y medios.

1.1. Líneas celulares ensayadas: HeLa y HFF-1

En los bioensayos realizados para estudiar el potencial biomédico de la *red box* se hizo uso de dos líneas celulares humanas distintas, para evaluar la existencia de diferencias en las mismas al aplicar el compuesto. La primera es una línea de células epiteliales HeLa, obtenida a partir de células tumorales de una paciente con cáncer de cérvix de 31 años en 1951 (HeLa ATTC[®] CCL.2[™]). La segunda línea, en cambio, son células no tumorales, fibroblastos, extraída originalmente de fibroblastos de prepucio humano de dos varones neonatos en 2003 (HFF-1 ATTC[®] SCRC-1041[™]). Ambas líneas se conservaron en crioviales en nitrógeno líquido (-196 °C) hasta su descongelación para la obtención de los

cultivos. Los cultivos se mantuvieron en un incubador Fisherbrand Isotemp™ (*ThermoFisher Scientific*, EE.UU) de atmosfera húmeda a 37 °C y 5 % CO₂.

1.2. Medios y condiciones de cultivo

Las células fueron cultivadas en un medio esencial mínimo, MEM (*Gibco-ThermoFisher Scientific*, EE. UU.) suplementado con un 10 % de suero fetal bovino, (SFB; *Gibco-ThermoFisher Scientific*, Sudamérica) y un 1 % de antibiótico penicilina/estreptomicina, (P/E; *Sigma-Aldrich*, EE. UU.). Para el lavado de las células, se utilizó tampón fosfato salino, (PBS; *Sigma-Aldrich*, EE. UU.). Los medios utilizados se conservaron en la nevera a 4 °C y, antes de ser utilizados, fueron atemperados en un baño termostático a 37 °C. Para garantizar el crecimiento celular en las condiciones adecuadas, los medios de cultivo fueron renovados 3 veces por semana, retirando el medio antiguo, lavando las monocapas celulares con 10 mL de PBS, y añadiendo de nuevo 15 mL de medio de cultivo (MEM, 10 % SFB, 1 % P/E).

1.3. Descongelación de las líneas celulares

La descongelación se llevó a cabo en el menor tiempo posible para preservar la integridad celular. Para ello, se suspendieron las células en 10 mL de medio atemperado en el interior de tubos cónicos de centrifuga de 15 mL. A continuación se procedió a la centrifugación de los tubos durante 6 min a T^a ambiente en una centrifuga Eppendorf 5340R a 1.650 rpm, con el fin de obtener el *pellet* celular y eliminar los restos de DMSO utilizado para la congelación. Posteriormente se retiró el sobrenadante y el precipitado fue resuspendido en 15 mL del medio de cultivo (MEM, 10 % SFB, 1 % P/E). Por último, la suspensión celular resultante fue trasvasada a un frasco de cultivo de 75 cm² con tapón ventilado Nunc™ EasYFlask™ (*ThermoFisher Scientific*, EE. UU.) que se incubó a 37 °C y 5 % CO₂ (Figura 2).

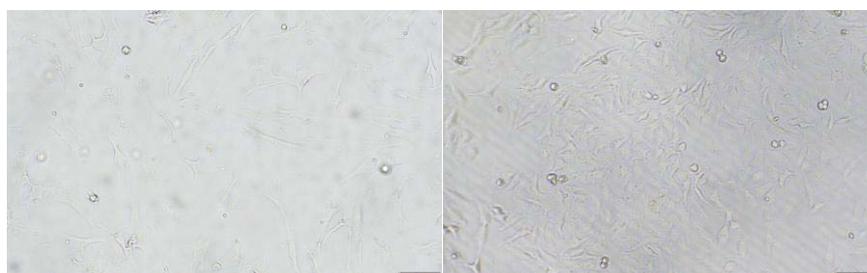


Figura 2. Imagen al microscopio óptico (10X; barra=100 μm) de las líneas HFF-1 (izquierda) y HeLa (derecha) tras la siembra en frasco

1.4. Pases celulares

Los cultivos celulares fueron periódicamente controlados para asegurarse de que las células se encontraban en las mejores condiciones de crecimiento hasta su uso en los distintos ensayos. Haciendo uso de un microscopio óptico invertido Olympus CKX53

(España) se realizó regularmente una inspección visual de los mismos para comprobar la ausencia de contaminación y que su estado de confluencia era el adecuado.

Cuando se observó una confluencia en torno al 80-90 % en el cultivo, se realizó un pase celular. Para ello, se retiró el medio antiguo del frasco y se lavó con 10 mL de PBS. A continuación, para despegar la monocapa de células del fondo del frasco se añadieron 5 mL de tripsina-EDTA 1X (*MP BiomedicalsTM*, España) y se incubó durante 5 min a 37 °C. Una vez verificado el desprendimiento de la monocapa celular al microscopio, se añadieron 10 mL de medio (MEM, 10 % SFB, 1 % P/E) para inactivar la enzima. Tras trasvasar la suspensión celular a un tubo de centrifuga de 50 mL, se centrifugó durante 5 min a 21 °C a 1.600 rpm, y el precipitado resultante fue resuspendido en 10 mL de medio (MEM, 10 % SFB, 1 % P/E). Antes de sembrar las células en un frasco de cultivo nuevo, fue necesario realizar un conteo de las mismas empleando una cámara de Neubauer (*Marienfield Superior*, Alemania). Para ello, se tomaron 10 µL de suspensión celular y se añadieron 10 µL de CorningTM azul tripán CellgroTM (*Fisher Scientific*, España), tinte que permite distinguir las células viables de las que están dañadas, internalizando estas últimas el colorante y tiñéndose de color azul, a diferencia de lo que ocurre en las no dañadas, que no se tiñen. Bajo el microscopio, se contaron las células viables (nº cel.) que se encontraban en el interior de las cuadrículas. De este modo, se estimó la concentración celular en el cultivo (células/mL, Ecuación 1), teniendo en cuenta el número de cuadrados (4), el volumen de mezcla introducido en la cámara (0,1 mm³) y el factor n de dilución de la mezcla (suspensión 1:1), de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\text{células/mL} = \frac{n^{\circ} \text{ cel.}}{4} \cdot 2 \cdot 10^4 \quad (1)$$

Una vez conocida la concentración celular, se re-sembraron 200.000 células por frasco de cultivo en un volumen final de 15 mL de medio (MEM, 10 % SFB, 1 % P/E).

2. Estudios de citocompatibilidad

2.1. Preparación de las disoluciones de *red box*

La *red box* se sintetizó anteriormente durante el trabajo experimental realizado en el TFG de Química, siendo un sólido pulverulento de color amarillo claro y con bromuro como contraión. Se preparó una disolución madre del macrociclo *red box* 1 mM en un matraz aforado de 10 mL, usando PBS como disolvente y utilizando un equipo de ultrasonidos Branson 2510 para facilitar la disolución del compuesto. En los ensayos de citocompatibilidad se evaluó el efecto de siete concentraciones diferentes de *red box* en las líneas HFF-1 y HeLa. Por lo tanto, a partir de esta disolución 1 mM, se prepararon una serie de diluciones seriadas en tubos de microcentrifuga de 2 mL: 0,5, 10, 50, 100, 200, 500 y 1.000 µM (Figura 3). En el ensayo, estas concentraciones fueron diluidas 1:10 en el medio

de cultivo, por lo que las concentraciones finales de estudio fueron 0,05; 1, 5, 10, 20, 50 y 100 μM .



Figura 3. Imagen de las disoluciones seriadas de red box, 0,5; 10, 50, 100, 200, 500 y 1.000 μM

2.2. Siembra de HFF-1 y HeLa en placa

Antes de la adición del macrociclo, se sembraron las células de ambos cultivos en placas adherentes de 24 o de 96 pocillos CorningTM (Fisher Scientific, España), en función del ensayo a realizar. Para ello se siguió el mismo procedimiento descrito en el apartado 1.4 para los pases celulares, por el cual se realizó un conteo del número de células del frasco, una vez despegadas. Después de hallar la concentración celular del cultivo (empleando la Ecuación 1), se hicieron los cálculos para sembrar 10.000 células/pocillo en la placa de 96 pocillos y 47.000 células/pocillo en la placa de 24 pocillos. Estos pasos fueron similares en ambas líneas celulares (HFF-1 y HeLa), (Figuras 11 y 12, Anexo), sembrando una placa para cada tiempo ensayado, 24 y 72 h. Tras la siembra, se verificó el estado de las células al microscopio y las placas fueron incubadas a 37 °C durante 24 h para permitir la adherencia celular.

2.3. Incubación de las células con disoluciones de red box

Una vez transcurridas las 24 h y tras examinar el estado de las células en el microscopio, se retiró el medio de los pocillos. En el caso de las placas de 96 pocillos, se añadieron a cada uno 90 μL de medio de cultivo nuevo (MEM, 10 % SFB, 1 % P/E). A continuación, se adicionó en cada pocillo 10 μL de la disolución correspondiente del macrociclo red box. En cambio, en las placas de 24 pocillos, se adicionaron 900 μL de medio y 100 μL de red box. Se realizaron triplicados de cada concentración de red box para cada línea celular y para cada tipo de ensayo. Del mismo modo, se ensayaron triplicados del control negativo y de los demás controles requeridos en cada tipo de ensayo, y que se especifican más adelante. Las placas se incubaron a 37°C durante 24 o 72 h hasta el momento de realizar el ensayo de citocompatibilidad.

2.4. Ensayos celulares

Se realizaron dos ensayos colorimétricos de cuantificación espectrofotométrica basados en la reducción enzimática de sales de tetrazolio, incoloras, para originar formazán, de color rojo, pudiendo así diferenciar las células metabólicamente activas de las muertas. Para estos ensayos se emplearon las líneas celulares HFF-1 y HeLa a dos tiempos de

incubación celular, 24 y 72 h, y a concentraciones de *red box* de 0,05; 1, 5, 10, 20, 50 o 100 μM . Además, para la línea HeLa a las concentraciones 20, 50 y 100 μM de *red box*, se midió la absorbancia correspondiente al sobrenadante tras 24 y 72 h y se realizó un lisado celular con el fin de medir la cantidad de proteína en los pocillos mediante otro ensayo de cuantificación espectrofotométrica, basado en la reducción enzimática de sales de cobre.

2.4.1. Ensayo WST-1

El ensayo WST-1 debe su nombre al reactivo empleado para la reducción del cloruro de tetrazolio a formazán, que contiene WST-1 (Cell Proliferation Reagent WST-1, Roche, España), una sal de color rojo claro y un agente de acoplamiento electrónico diluidos en un tampón fosfato salino. La reacción redox tiene lugar en el sistema mitocondrial succinato-tetrazolio reductasa y es dependiente de la oxidación de NADH a NAD^+ (Figura 4). La NADH deshidrogenasa no es capaz de por sí de transferir electrones a la sal de tetrazolio, por lo que es necesario la presencia de un intermediario, como la menadiona (Martínez et al., 2008). De este modo, al medir la cantidad de formazán, cuya formación está directamente correlacionada con la actividad de las deshidrogenasas mitocondriales, podemos conocer el número de células metabólicamente activas. Por lo tanto, mediante medidas de absorbancia, podemos conocer la viabilidad celular en los cultivos, de forma que valores elevados de absorbancia se correlacionan con alta viabilidad (Roche, 2021).

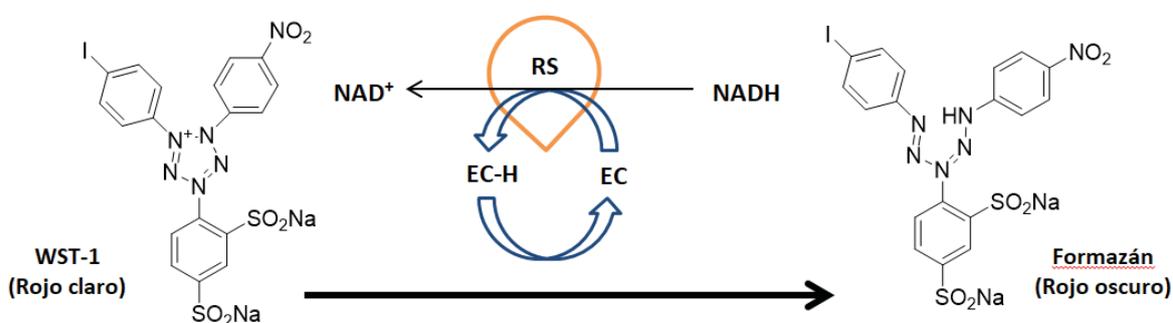


Figura 4. Mecanismo de conversión de la sal WST-1 (4-[3-(4-iodofenil)-2-(4-nitro-fenilo)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benceno disulfonato) a formazán, en donde EC es el reactivo de acoplamiento electrónico y RS, el sistema mitocondrial succinato-tetrazolio reductasa (Roche, 2021)

El porcentaje de viabilidad celular se calculó de acuerdo a la siguiente ecuación (Ecuación 2), para la cual se requiere la inclusión de un control negativo en el ensayo, que se corresponde con la actividad celular normal en ausencia del compuesto a ensayar, es decir a la de las células cultivadas en medio MEM, 10 % SFB, 1 % P/E.

$$\% \text{ Viabilidad celular} = \left(\frac{\text{Absorbancia muestra}}{\text{Media Absorbancia control negativo}} \right) \cdot 100 \quad (2)$$

En paralelo, se determinó el índice de proliferación celular en presencia de las distintas concentraciones de compuesto a largo del tiempo y para cada línea celular,

mediante la representación de los valores de absorbancia brutos medidos para cada concentración.

2.4.1.1. Procedimiento del ensayo WST-1

Una vez han transcurridas las 24 o 72 h de incubación y tras evaluar el estado de las células al microscopio, se retiró el medio de cultivo y se hizo un lavado de las monocapas con medio MEM sin suplementar (100 μL en las placas de 96 pocillos o 1.000 μL en las placas de 24 pocillos). Posteriormente se añadió medio nuevo (90 μL en las placas de 96 pocillos y 900 μL en las placas de 24 pocillos) junto con el reactivo WST-1 (10 μL en las placas de 96 pocillos y 100 μL en las placas de 24 pocillos). Las placas fueron incubadas a 37 °C durante 2 horas y media, tomando medidas de absorbancia cada 30 min para realizar un seguimiento de los valores de la misma a largo del tiempo. La absorbancia se midió en un espectrofotómetro de placas SinergyHTX (Biotek, EE. UU.) con filtro de 450 nm y los datos se procesaron mediante el programa informático Gen5.

2.4.2. Ensayo LDH

En este ensayo se utilizó el kit *Pierce LDH Cytotoxicity Assay* (ThermoFisher Scientific, EE. UU.) para cuantificar la citotoxicidad del compuesto en contacto con las células (Figura 5). Se basa en la liberación de la enzima citosólica lactato deshidrogenasa (LDH) al medio cuando se daña la membrana plasmática. Se cuantifica la presencia extracelular de LDH a través de una reacción enzimática acoplada en donde la LDH cataliza la conversión de lactato en piruvato, mediante la reducción de NAD^+ a NADH. El NADH producido se utiliza para la reducción de una sal de tetrazolio (INT) a formazán. Así, la cantidad de formazán es proporcional a la cantidad de LDH liberada, que se correlaciona con la citotoxicidad celular (ThermoFisher Scientific, 2014).

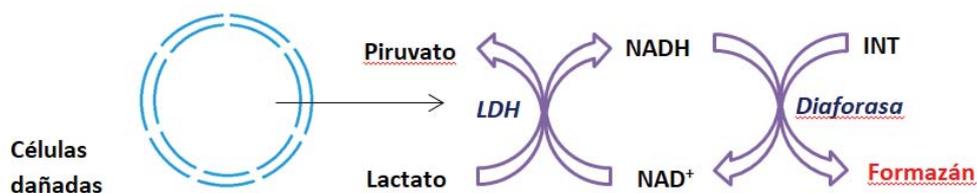


Figura 5. Mecanismo de la reducción de INT a formazán en el ensayo LDH (Thermo-Scientific, 2014)

Así, mediante la medida de la absorbancia se calculó el porcentaje de citotoxicidad celular (Ecuación 3). En este ensayo, se midió la absorbancia de las muestras tratadas con la *red box* y la de dos controles: de actividad máxima de la LDH (control positivo) y de la actividad espontánea de la LDH. Para el control positivo, con el fin de calcular la cantidad máxima de LDH liberada al medio, se lisaron las células de modo que al romper la membrana plasmática, se favoreciese la salida de la enzima al medio. En cambio, para determinar la actividad espontánea, se cultivaron las células en medio MEM, 10 % SFB,

1 % P/E con PBS pero sin compuesto. Además, para poder determinar si el compuesto interfiere en la medida, se prepararon blancos del compuesto en medio MEM, 10 % SFB, 1 % P/E para cada concentración, y blancos sólo de medio MEM, 10 % SFB, 1 % P/E. De este modo, al valor de la absorbancia de las muestras se le restó el valor del blanco de los compuestos y, al de los controles, el valor del blanco del medio. La absorbancia se midió a dos longitudes de onda (490 y 680 nm) con el fin de substrair los valores de absorbancia de fondo (680 nm) a aquellos medidos a 490 nm (ThermoFisher Scientific, 2014).

$$\% \text{ Citotoxicidad} = \left(\frac{\text{Abs activ. LDH muestra} - \text{Abs activ. LDH espontánea}}{\text{Abs máx activ. LDH} - \text{Abs activ. LDH espontánea}} \right) \cdot 100 \quad (3)$$

2.4.2.1. Procedimiento del ensayo LDH

Después de 24 o 72 h de incubación, se tomaron alícuotas de 50 μL del sobrenadante de cada pocillo y se transfirieron a una placa nueva de 96 pocillos, respetando el diseño original de la placa. A los pocillos correspondientes a los controles positivos se les añadió 30 μL de un tampón de lisis que se incubaron durante 45 min a 37 $^{\circ}\text{C}$. Tras la lisis celular, se transfirieron los sobrenadantes a la placa de 96 pocillos (50 μL) junto con el resto de muestras. Posteriormente se preparó la mezcla de reacción, de acuerdo con las indicaciones del fabricante, y se añadieron a cada pocillo 50 μL . La placa fue incubada a T^a ambiente durante 30 min en ausencia de luz y, una vez transcurrido ese tiempo, se adicionó a cada pocillo 50 μL de una disolución de parada. Por último, se midió la absorbancia de la placa a 450 y a 680 nm, tal y como se expuso anteriormente en el apartado 2.4.2.

2.4.3. Ensayo BCA

El ensayo BCA se realizó con el fin determinar la cantidad de proteínas en cada pocillo tratado con las concentraciones más elevadas de *red box* ensayadas (20, 50 y 100 μM) a las 24 y 72 h de tratamiento. Este ensayo fue realizado en la línea celular HeLa mediante el kit Micro BCA TM (ThermoFisher Scientific, EE.UU.), el cual usa ácido bicinconínico (BCA) para detectar la reducción de Cu^{2+} a Cu^{+1} por proteínas en medio alcalino (Figura 6). El ión Cu^{1+} forma un compuesto quelato con dos moléculas de BCA de color violeta, que absorbe a 562 nm, por lo que se puede detectar por espectrofotometría. La cantidad de Cu^{2+} reducida es proporcional a la cantidad de proteína (ThermoFisher Scientific, 2015).

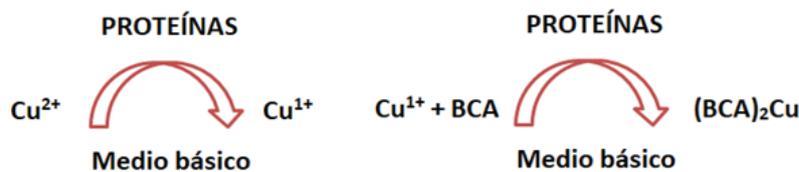


Figura 6. Mecanismo de la reducción de Cu^{2+} a Cu^{+1} en el ensayo BCA (ThermoFisher Scientific, 2015)

Para calcular la cantidad de proteína en cada pocillo hay que comparar sus valores de absorbancia con aquellos obtenidos con una proteína conocida. Para ello, se realizó una recta de calibrado con seroalbúmina bovina (BSA) con cuya ecuación de la recta, se calcularon las concentraciones de proteína existentes en cada pocillo ($\mu\text{g/mL}$). Así, teniendo en cuenta la dilución realizada y el volumen de muestra en el pocillo, se hallaron las cantidades de proteína por pocillo (μg)

2.4.3.1. Procedimiento del lisado para el ensayo BCA

Después de 24 o 72 h de incubación, se realizó en primer un lugar un lavado de las monocapas celulares de cada pocillo con 900 μL de medio MEM sin suplementar y, una vez eliminado, se añadió a cada pocillo 250 μL de tampón de lisis 1X, previamente diluido 1:5 a partir del reactivo original (Cell Culture Lysis Reagent 5X; *Promega*, EE. UU.). Con el fin de favorecer la lisis celular se raspó cada pocillo durante 5 min y los lisados resultantes fueron transferidos a tubos de microcentrifuga de 2 mL y centrifugados durante 15 min a 4 °C y 5.000 rpm para precipitar los posibles restos celulares, que pudieran interferir en las medidas de absorbancia. Tras la centrifugación los sobrenadante fueron almacenados a -20 °C.

2.4.3.2. Procedimiento del ensayo BCA

En primer lugar, se prepararon las disoluciones seriadas para hacer la recta de calibrado de BSA. Para ello, a partir de una disolución madre de BSA de concentración inicial 2.000 $\mu\text{g/mL}$, se preparan disoluciones de 0, 1, 2,5; 5, 10, 20 y 40 $\mu\text{g/mL}$ en tampón de lisis 0,01X. Estas disoluciones (150 μL) fueron posteriormente transferidas a la placa de 96 pocillos por triplicado para construir la recta de calibrado (Tabla 2 y Figura 13, Anexo). En los pocillos correspondientes a las muestras, se añadieron 5 μL de los lisados de las células HeLa (previamente descongelados) y 145 μL de agua miliQ. A continuación, se preparó la mezcla de reacción de acuerdo a las indicaciones del fabricante y se añadieron 150 μL de la misma a todos los pocillos. La placa fue incubada durante 2 h a 37 °C y se midió la absorbancia a 562 nm en el espectrofotómetro.

2.4.4. Medida de la absorbancia de *red box* en el medio de cultivo

En una de las líneas celulares ensayadas, HeLa, se midió la absorbancia del medio de cultivo celular conteniendo el compuesto en un espectrofotómetro JASCO UV-Vis/NIR Spectrophotometer V-650 (*Jasco*, Japón) como medida indirecta de la cantidad de *red box* internalizada. Como el macrociclo presenta una forma ácida ($\lambda=365$ nm) y una forma básica ($\lambda=465$ nm), se hicieron medidas de las muestras a pH 11 (básico) y pH 4 (ácido). Para ello se usaron tampones $\text{H}_3\text{PO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ y $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{ácido cítrico}$, respectivamente, para asegurarse de que el macrociclo se encontrase solo en una de sus dos formas. Los

valores de absorbancia medidos en el medio de cultivo de las células sin tratar (control negativo) fueron utilizados como blanco y sustraídos a las medidas de absorbancia de la *red box* del mismo punto de tiempo. Para hacer la medida, las muestras de medio de cultivo se diluyeron previamente en medio MEM, 10 % SFB, 1 % P/E (dilución 1:7).

2.5. Análisis de datos

Cada condición experimental fue ensayada por triplicado dentro del mismo experimento. El ensayo WST-1 fue además repetido en 2 experimentos independientes. Los datos se expresaron como media y se calculó la desviación típica de los mismos (SD). La distribución de los datos se ajustó a la normalidad según el test de Shapiro-Wilks por lo que se utilizó el test *t-Student* para evaluar diferencias entre grupos. Un p -valor $<0,05$ fue considerado como estadísticamente significativo. Los análisis estadísticos fueron realizados mediante el software SPSS (IBM Statistics version 23) y Excel.

RESULTADOS

1. Ensayos de citocompatibilidad

En los ensayos realizados (WST-1 y LDH), una vez incubadas ambas líneas (HFF-1 y HeLa) durante 24 y 72 h con la *red box*, se comprobó el estado de las células en el microscopio. En ningún caso se advirtieron cambios notables en la morfología celular indicativos de muerte celular. Además, no se observó ningún acúmulo del compuesto, que es de color rojo, en los pocillos por lo que se asumió que la disolución del mismo en el medio de cultivo fue total. En el Anexo (Figuras 14 y 15), se muestra el estado de los cultivos de HeLa y HFF-1 tras 24 h de incubación con 20, 50 y 100 μ M de *red box*.

El tratamiento de los cultivos con los reactivos colorimétricos WST-1 o LDH permite relacionar la viabilidad celular, de manera directa e indirecta, respectivamente, con la cantidad de formazán generado, que resulta en un cambio de color a rojo en el medio de cultivo. En el Anexo, se muestra una comparación del aspecto de las placas para el ensayo WST-1 (Figuras 16 y 17).

Con el fin de obtener un perfil de citotoxicidad del macrociclo *red box*, se estudió en primer el efecto de varias concentraciones del mismo sobre las líneas celulares HeLa y HFF-1 tras 24 h de incubación. En la Figura 7, se pueden ver los resultados obtenidos para las células HeLa y HFF-1 tras 24 h de exposición a las diferentes concentraciones del compuesto. Los resultados mostraron mayores porcentajes de supervivencia celular en presencia de la *red box* en la línea celular HeLa que en la línea HFF-1, siendo éstos superiores al 86 % (HeLa) y al 60 % (HFF-1), respectivamente. Al comparar la misma

concentración de compuesto en ambas líneas, solo se observaron diferencias estadísticamente significativas al 95 %, mediante la prueba *t-student* a las concentraciones de 0,05; 20, 50 y 100 μM ($p \leq 0,01$; $\alpha = 0,05$), probablemente debido a la alta dispersión de los datos observada en la línea celular tumoral. En los Anexos, se exponen los datos numéricos para HeLa y HFF-1 (Tablas 3 y 4).

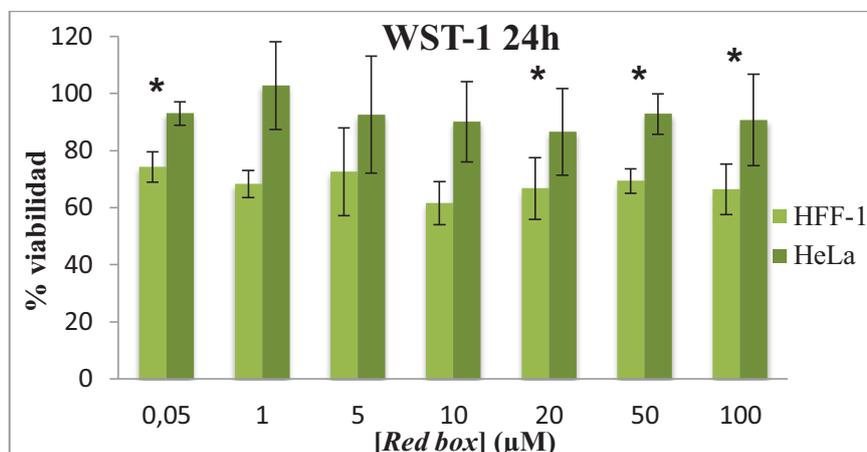


Figura 7. Efecto de la red box a las concentraciones indicadas sobre la viabilidad de las células HFF-1 y HeLa tras 24 h de incubación (ensayo WST-1). Las barras de error representan la SD de las 6 réplicas y * indica la existencia de diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) tras comparar concentraciones iguales de compuesto en ambas líneas

Tras analizar el perfil de citotoxicidad de las diferentes concentraciones del compuesto tras 24 h de exposición, se evaluó la toxicidad del mismo a lo largo del tiempo en cada línea celular. Para ello se seleccionaron las concentraciones más elevadas de *red box* (20, 50 y 100 μM) y se evaluó su efecto tras 24 y 72 h de incubación en ambas líneas celulares (Figura 8). La proliferación celular en contacto con las distintas concentraciones fue estimada mediante el ensayo WST-1 (Figura 8).

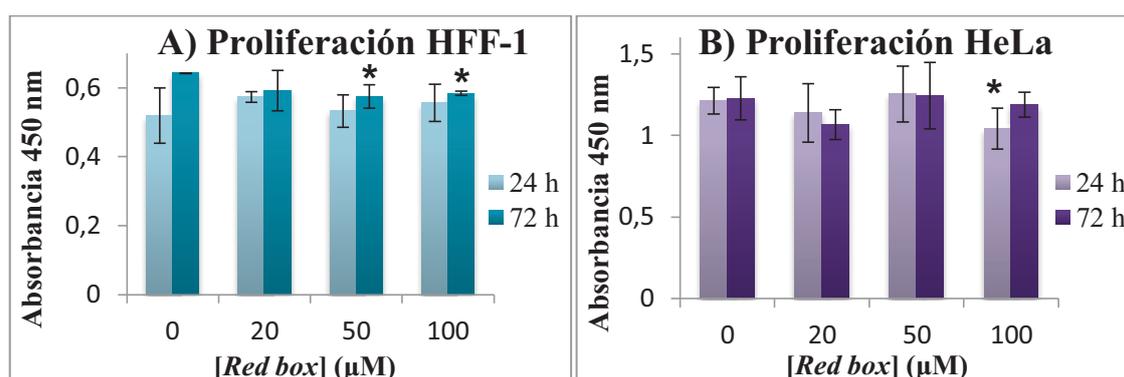


Figura 8. Proliferación celular de HFF-1 (A) y HeLa (B) en presencia de las concentraciones 20, 50 y 100 μM de red box tras 24 y 72 h de incubación. La concentración 0 μM representa a las células sin tratar (control negativo), Las barras de error representan la SD de las 3 réplicas y * indica la existencia de diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) tras comparar los valores de absorbancia del compuesto con los obtenidos con el control negativo de células, al mismo tiempo de incubación.

La proliferación de las células HFF-1 en contacto con las distintas concentraciones de *red box* fue ligeramente inferior (Figura 8A) a la proliferación de las HeLa (Figura 8B).

Tras comparar la proliferación celular en presencia del compuesto con aquella registrada en el control negativo de células (0 μM), se observó una reducción significativa de la misma en las células HFF-1 tras ser incubadas con las concentraciones más altas de compuesto (50 y 100 μM) tras 72 h de contacto ($p \leq 0,04$; $\alpha = 0,05$). En contra, en las células HeLa solo se constató una reducción significativa de la proliferación a la mayor concentración de compuesto y tras 24 h de incubación ($p = 0,01$; $\alpha = 0,05$). No se encontraron diferencias significativas tras comparar una misma concentración de *red box* a las 24 y 72 h de incubación en ninguna de las líneas celulares ($p \geq 0,08$). Los datos numéricos se pueden ver en el Anexo (Tablas 5, 6 y 7).

De igual modo, el ensayo LDH (Figura 9) mostró valores muy reducidos de toxicidad celular, siendo estos superiores en las HFF-1 (Figura 9A) que en las HeLa (Figura 9B). En ambos casos, sólo se registró citotoxicidad celular a la mayor concentración de compuesto ensayada (100 μM) hasta porcentajes de 27 % en las HFF-1 y hasta un 15 % en las HeLa. Asimismo en ambas líneas celulares se constató una reducción de la citotoxicidad del compuesto con el tiempo de exposición al mismo, existiendo diferencias significativas entre los dos tiempos ensayados ($p \leq 0,04$; $\alpha = 0,05$). Los datos numéricos se pueden ver en el Anexo (Tablas 8 y 9).

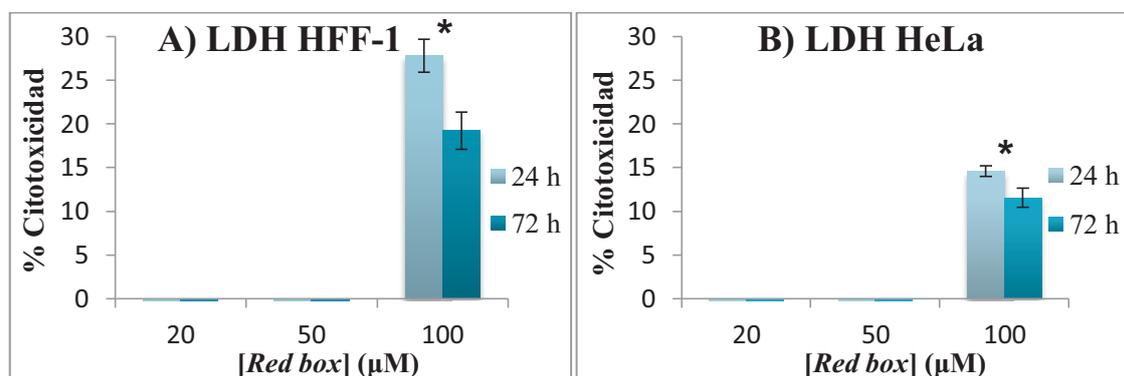


Figura 9. Citotoxicidad sobre las células HFF-1 (A) y HeLa (B) a las concentraciones ensayadas de *red box* tras 24 y 72 h de incubación (ensayo LDH). Las barras de error representan la SD de las 3 réplicas y * indica la existencia de diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) tras comparar los valores de absorbancia del compuesto a los distintos tiempos de incubación

2. Estudio indirecto de la internalización de *red box* en células HeLa

La cuantificación mediante medidas espectrofotométricas de la cantidad de *red box* presente en el medio de cultivo, nos permite obtener una idea, de forma indirecta, de la medida en la que el compuesto ha sido internalizado por las células a lo largo del tiempo. Debido a que el macrociclo estudiado presenta dos formas de distinta carga resultado de un equilibrio ácido-base, se tomaron las medidas a pH ácido (pH=4) y pH básico (pH=11) para asegurarse de que se encontraba totalmente disociado en una de ellas. Los datos obtenidos fueron normalizados por el contenido de proteína de cada pocillo con el fin de dar una estimación de la cantidad de *red box* internalizada en función del contenido proteico celular

(Tabla 1). En todos los casos la cantidad de proteína resultó incrementada con el aumento del tiempo de incubación, aunque no se encontraron diferencias significativas tras comparar una misma concentración de *red box* a las 24 y 72 h de incubación ($p \geq 0,09$). Además en concordancia con los ensayos anteriores, se cuantificó una menor cantidad de proteína cuando las células HeLa fueron tratadas con la mayor concentración de *red box* (100 μM).

	24 h	72 h
[Red Box](μM)	[Proteína] ($\mu\text{g}/\text{poc}$)	[Proteína] ($\mu\text{g}/\text{poc}$)
0	654,8 \pm 113,4	763,0 \pm 116,4
20	640,6 \pm 137,5	740,5 \pm 86,3
50	510,5 \pm 38,6	685,1 \pm 177,6
100	432,6 \pm 0,0	544,9 \pm 101,3

Tabla 1. Medida de la cantidad de proteína por pocillo medida en el ensayo de internalización celular. Se muestran los valores medios \pm SD correspondientes a 3 réplicas

En la Figura 10, se muestran las cantidades de *red box* internalizadas normalizadas por la cantidad de proteína en cada pocillo, a ambos pHs (ver en Anexos, Tablas 10-13). Los datos obtenidos mostraron una elevada dispersión a ambos pHs, si bien en ambos casos se pudo confirmar la internalización de cierta cantidad de *red box*. Las cantidades de macrociclo internalizadas fueron mayores a pH básico que a pH ácido, siendo en ambos casos el macrociclo a la mayor concentración estudiada (100 μM) y a las 24 h de contacto, el que dio lugar a una mayor internalización ($\sim 3,8$ y $\sim 8,3$ % de la cantidad añadida al medio de cultivo a pH ácido y básico, respectivamente).

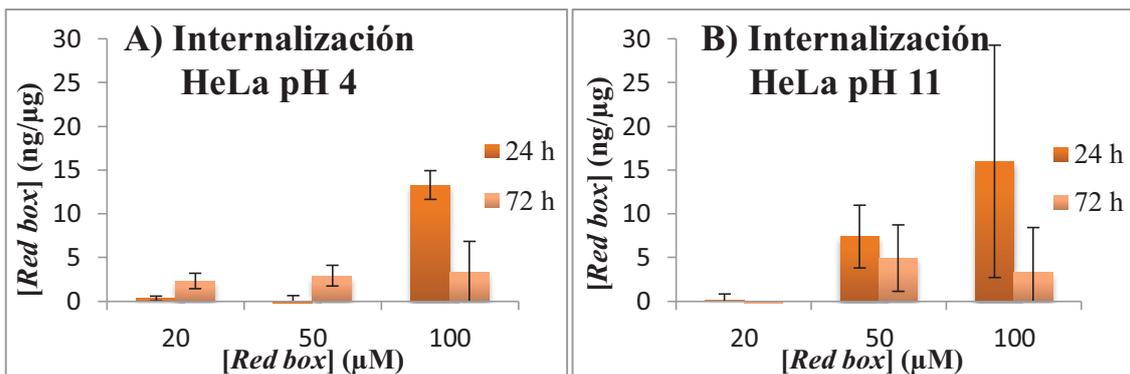


Figura 10. Internalización de la red box en las células HeLa, tras 24 y 72 h de incubación. Las medias se realizaron a pH ácido (A) y a pH básico (B). Se muestran los datos de cantidad de red box normalizados con respecto a la cantidad de proteína en los pocillos. Las barras de error representan la SD de las 3 réplicas

DISCUSIÓN

Como primer paso en el estudio de su biocompatibilidad, se llevaron a cabo ensayos de viabilidad, proliferación celular y citotoxicidad del macrociclo *red box* al exponer dos líneas celulares distintas, HeLa (línea tumoral) y HFF-1 (línea normal), a distintas

concentraciones del compuesto a dos tiempos de exposición (24 y 72 h). Estos ensayos de biocompatibilidad que miden el número de células viables han sido ampliamente utilizados para evaluar la citocompatibilidad de diferentes compuestos (Niles et al., 2009). En el presente trabajo se seleccionó el método WST-1 por su alta sensibilidad y su solubilidad en agua permitiendo medir los valores de la absorbancia desde los primeras etapas de la incubación, a diferencia de otros compuestos que requieren la disolución de las sales insolubles de tetrazolio como el MTT (Riss et al., 2004b). Otro de los métodos seleccionados fue el ensayo LDH en el que se puede estimar el número de células muertas en el cultivo, tomando como base la pérdida de integridad de la membrana plasmática (Riss et al., 2004a). En ambos, los datos se registran haciendo uso de un lector de placas.

Además con el fin de realizar una primera estimación de cómo se internaliza el macrociclo *red box* en las células, se utilizaron métodos espectrofotométricos para cuantificar su concentración en el medio de cultivo celular. Debido a que el macrociclo *red box* presenta dos bandas de absorción características a $\lambda=365\text{nm}$ y $\lambda=465\text{ nm}$, correspondientes a su forma ácida y básica, respectivamente se realizó un ajuste del pH del medio de cultivo celular a estos pHs (Blanco-Gómez et al., 2019b). Estas bandas no interfieren con el pico máximo de absorción del formazán ni con las longitudes de onda registradas en el ensayo. Además, se midió el contenido en proteínas de cada pocillo para poder dar un valor normalizado de la cantidad de *red box* internalizada en función de la cantidad de proteínas, siendo un valor indirecto del número de células en cada pocillo (Butler et al., 2014) al ser tratadas con las distintas concentraciones de *red box*.

Los resultados obtenidos en el estudio de la viabilidad celular del ensayo WST-1 (Figura 7), que mide los porcentajes de células viables tras el tratamiento, demostraron que la *red box* no presenta una elevada citotoxicidad a ninguna de las concentraciones estudiadas ni tiempos de exposición en ninguna de las dos líneas celulares ensayadas (HeLa y HFF-1). Cuando se comparó la viabilidad en ambas líneas celulares se observó que los valores de la misma fueron generalmente superiores en la línea tumoral que en la línea fibroblástica, si bien estos valores fueron siempre superiores al 60 %. En este sentido tomando como referencia la norma ISO para evaluar la citotoxicidad en dispositivos médicos (International Standard ISO 10993-5, 2009), por la cual se considera como citotóxico a un compuesto que reduce la viabilidad en más de un 30 %, la *red box* no sería un compuesto citotóxico a ninguna de las concentraciones de estudio en las células HeLa. Por otro lado, en las células HFF-1, la *red box* sería citotóxica a todas las concentraciones ensayadas, excepto a 0,05 y 5 μM . Las diferencias observadas en ambas líneas celulares podría deberse al carácter no tumoral de la línea fibroblástica lo que podría llevar a una mayor sensibilidad del compuesto.

Los datos del índice de proliferación, que está relacionado con el crecimiento y la multiplicación celular, indican que la proliferación de las células HeLa fue aproximadamente el doble que la de las células HFF-1. El tratamiento de las células HFF-1 con las concentraciones más altas de *red box* (50 y 100 μM) durante 72 h, resultó en una disminución de la proliferación celular con respecto al control de células sin tratar. Sin embargo en las células HeLa esta reducción solo fue patente a la concentración más alta de *red box* (100 μM) tras 24 h de exposición. Estas observaciones podrían ser explicadas por la mayor tasa de proliferación de las células HeLa en comparación con las células normales, al tratarse de células tumorales con crecimiento rápido e infinito (Andreeff et al., 2003). Asimismo, las células HFF-1 podrían tener una mayor permeabilidad al compuesto estudiado, lo que explicaría su menor proliferación en presencia del mismo con respecto a las células HeLa. Los fibroblastos humanos presentan receptores purinérgicos del subtipo P2X7, cuya activación provoca la formación de canales de membrana que parecen promover la internalización de determinadas sondas fluorescentes (Gan et al., 1998), por lo que la entrada de la *red box* podría estar más favorecida en las células HFF-1 que en las HeLa (Solini et al., 1999). Cuando se estudió la citotoxicidad de la *red box* a lo largo del tiempo en cada línea celular mediante el ensayo LDH, se vio que si bien el compuesto no fue citotóxico a las concentraciones más bajas (20 y 50 μM), sí que presentó una cierta citotoxicidad a la concentración de 100 μM . Además la citotoxicidad fue mayor en las células HFF-1 (27 %), que en las células HeLa (15 %) tras 24 h de exposición. Esta menor citotoxicidad en las células HeLa concuerda con los datos de proliferación, ya que las células HeLa se multiplican a una mayor velocidad que HFF-1, que sumado al hecho de que las HFF-1 pudiesen ser más permeable a la *red box*, podría llevar a una menor citotoxicidad en las primeras. Es preciso señalar que el ensayo LDH presenta una menor sensibilidad que el ensayo WST-1, motivo por el cual solo se detectó citotoxicidad a la concentración de 100 μM . Esto puede ser debido al distinto mecanismo de liberación del formazán, lo cual resultaría en una distinta sensibilidad. En el ensayo WST-1, el formazán se forma por la acción de las deshidrogenasas en la mitocondria, que reducen a la sal de tetrazolio con la ayuda de un intermediario electrónico. A pesar de tener una baja citotoxicidad, la internalización del compuesto va a producir un cambio apreciable en la actividad metabólica celular. Por el contrario, en el ensayo LDH, para reducir el formazán, tiene que producirse la rotura celular para que la lactato deshidrogenasa se libere al medio externo. De este modo, es posible que el tiempo ensayado no haya sido suficiente para producir la fragmentación de la membrana plasmática. Además, si el compuesto es poco citotóxico, puede que a las concentraciones estudiadas, no induzca daño sobre la membrana celular o que no se observen grandes diferencias entre los controles y las muestras al tener que utilizar blancos correspondientes a cada concentración de compuesto.

Finalmente, dado que actualmente se desconoce cuál es el mecanismo que utiliza el macrociclo *red box* para atravesar la membrana plasmática, se realizó un estudio de su internalización celular mediante medidas de absorbancia con el fin de realizar una aproximación preliminar de la cantidad del mismo que entra en la célula. Se eligió para ello la línea celular HeLa, en la que se evidenció una menor citotoxicidad y a las concentraciones de 20, 50 y 100 μM para que su concentración pudiese ser medida en un espectrofotómetro. Las medidas de absorbancia fueron normalizadas con respecto al contenido proteico en cada pocillo, con el fin de dar una estimación de la *red box* internalizada en función del índice metabólico celular. Así el ensayo de cuantificación de proteínas totales puede ser considerado como un método indirecto del crecimiento celular. De este modo una mayor cantidad de proteínas se puede relacionar con un mayor número de células, si bien esta medida se puede ver afectada por cambios en la tasa de crecimiento o en la composición del medio de cultivo (Butler et al., 2014). Los resultados del ensayo BCA mostraron una menor cantidad de proteínas tras la exposición de las células a la mayor concentración de *red box* (100 μM). Asimismo, la cantidad de proteína se vio incrementada a lo largo del tiempo, a todas las concentraciones de *red box* ensayadas, lo que parece indicativo de la existencia de un mayor número de células tras 72 h de incubación. Estos resultados concuerdan con los del ensayo de proliferación celular de la células HeLa (Figura 8B) en el que no se evidenció una disminución significativa de la misma con el tiempo de incubación, y el de citotoxicidad celular (Figura 9B) en el que se constató una reducción su efecto citotóxico tras 72 h de exposición a una concentración de 100 μM del compuesto.

La medida de la absorbancia a pH ácido y básico permitió obtener resultados para la forma ácida y básica de la *red box*. En ambos casos, el equipo no presentó una sensibilidad muy adecuada para la medida de las muestras a 20 μM , porque los datos se encontraban al límite de la ley de Lambert-Beer. En cambio, para las muestras de 100 μM , se determinó que la *red box* se internalizaba alrededor de 5-16 ng/ μg proteína a las 24 h de contacto para las medidas en la forma ácida y básica respectivamente. En este sentido, la mayor citotoxicidad de la *red box* a la concentración de 100 μM detectada tras 24 h de exposición en los ensayos WST-1, LDH y BCA podría apuntar a una mayor internalización de la misma a este tiempo. No obstante, si bien estas observaciones parecen indicar que la internalización del compuesto es un proceso rápido que ocurre en mayor medida durante las primeras horas de incubación, se requieren otros métodos como la medición de la cantidad de *red box* presente en el lisado celular mediante otros métodos como HPLC (Zhang et al., 2019) para poder obtener resultados más precisos.

CONCLUSIONES

Según los datos obtenidos del estudio de viabilidad celular e internalización del macrociclo *red box*, se pueden extraer las siguientes conclusiones:

- De acuerdo a la normativa ISO vigente, el compuesto *red box* no resultó citotóxico a ninguna de las concentraciones ni tiempos ensayados en la línea celular HeLa, pero si en la HFF-1 (excepto a las concentraciones de 0,05 y 5 μM).
- La proliferación celular en contacto con el macrociclo *red box* fue menor en las células fibroblásticas que en las tumorales, lo cual podría estar relacionado con la mayor velocidad de división de las células cancerosas y/o una mayor permeabilidad al compuesto de la línea no tumoral.
- El ensayo de citotoxicidad celular mostró una mayor toxicidad del macrociclo a la concentración de 100 μM y tras 24 h de incubación en ambas líneas celulares. Además en las condiciones estudiadas, el ensayo WST-1 demostró tener una mayor sensibilidad que el ensayo LDH para estudiar la citocompatibilidad del macrociclo *red box*.
- La cuantificación de la cantidad de proteína realizada en las células HeLa mostró mayores cantidades de la misma al tiempo de exposición más largo con el compuesto, lo que parece indicativo de la existencia de un mayor número de células.
- El estudio preliminar de internalización celular en HeLa reveló la entrada de un pequeño porcentaje de *red box* en el interior de las células siendo mayor al menor tiempo de exposición (24 h), si bien se requieren otros métodos más sensibles para cuantificar las cantidades internalizadas de este compuesto.

CONCLUSIÓNS

Segundo os datos obtidos do estudio de viabilidade celular e internalización do macrociclo *red box*, pódense extraer as seguintes conclusións:

- Dacordo á normativa ISO vixente, o composto *red box* non resultou citotóxico a ningunha das concentracións nin tempos ensaiados na liña celular HeLa, pero si en HFF-1 (excepto ás concentracións de 0,05 e 5 μM).
- A proliferación celular en contacto co macrociclo *red box* foi menor nas células fibroblásticas que nas tumorais, o cal podería estar relacionado coa maior velocidade de división das células cancerosas e/ou unha maior permeabilidade ao composto da liña non tumoral.

- O ensaio de citotoxicidade celular mostrou unha maior toxicidade do macrociclo á concentración de 100 μM e tras 24 h de incubación en ambas liñas celulares. Ademais nas condicións estudadas, o ensaio WST-1 demostrou ter unha maior sensibilidade que o ensaio LDH para estudar a citocompatibilidade do macrociclo *red box*.
- A cuantificación da cantidade de proteína realizada nas células HeLa mostrou maiores cantidades da mesma ao tempo de exposición máis longo co composto, o que parece indicativo da existencia dun maior número de células.
- O estudo preliminar da internalización celular revelou a entrada dunha pequena porcentaxe de *red box* no interior das células, sendo maior ao menor tempo de exposición (24 h), aínda que se requiren outros métodos máis sensibles para cuantificar as cantidades internalizadas deste composto.

CONCLUSIONS

According to the data obtained from the cell viability and internalization study of the *red box* macrocycle, the following conclusions can be drawn:

- According to current ISO regulations, the *red box* compound was not cytotoxic at none of the concentrations or time points tested in HeLa cell line, but it was in HFF-1 (except at concentrations of 0,05 and 5 μM).
- Cell proliferation in contact with the *red box* macrocycle was lower in fibroblast cells than in tumor cells, which may be related to the higher rate of division of cancer cells and/or a higher permeability to the compound of the non-tumour cell line.
- The cell cytotoxicity assay showed the highest macrocycle cytotoxicity at the concentration of 100 μM and after 24 h of incubation, in both cell lines. Furthermore, under the conditions studied, the WST-1 assay showed to have a higher sensitivity than the LDH assay to study the cytocompatibility of the *red box* macrocycle.
- The quantification of the amount of protein carried out in the HeLa cells showed higher amounts of it at the longest exposure time, which seems to indicate the existence of a greater number of cells.
- The preliminary study of cell internalization revealed the entry of a small percentage of *red box* inside the cells, being greater at the shortest exposure time (24 h), although other more sensitive methods are required to quantify the internalized amounts of this compound.

BIBLIOGRAFÍA

- Andreeff, M., Goodrich, D.W., & Pardee, A.B. (2003). *Proliferation*. In Kufe, D.W., Pollock, R.E., Weichselbaum, M.D., Bast, R.C., Gansler, T.S., Holland, J.F., & Frei, E. III (Eds.), *Holland-Frei Cancer Medicine*. BC Decker Inc. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK13035/>
- Asakawa, M., Dehaen, W., L'abbé, G., Menzer, S., Nouwen, J., Raymo, F.M., Stoddart, J.F., & Williams, D.J. (1996). Improved template-directed synthesis of cyclobis(paraquat-p-phenylene). *Journal of Organic Chemistry*, *61*(26), 9591–9595. <https://doi.org/10.1021/jo961488i>
- Bernardo, A.R., Stoddart, J.F., & Kaifer, A.E. (1992). Cyclobis(paraquat-p-phenylene) as a Synthetic Receptor for Electron-Rich Aromatic Compounds: Electrochemical and Spectroscopic Studies of Neurotransmitter Binding. *Journal of the American Chemical Society*, *114*(26), 10624–10631. <https://doi.org/10.1021/ja00052a069>
- Blanco-Gómez, A., Fernández-Blanco, Á., Blanco, V., Rodríguez, J., Peinador, C., & García, M.D. (2019a). Thinking outside the “Blue Box”: Induced fit within a unique self-assembled polycationic cyclophane. *Journal of the American Chemical Society*, *141*(9), 3959–3964. <https://doi.org/10.1021/jacs.8b12599>
- Blanco-Gómez, A., Neira, I., Barriada, J.L., Melle-Franco, M., Peinador, C., & García, M.D. (2019b). Thinking outside the “Blue Box”: From molecular to supramolecular pH-responsiveness. *Chemical Science*, *10*(46), 10680–10686. <https://doi.org/10.1039/C9SC04489B>
- Blanco, J., Vila-jato, J.L., Otero, F., & Anguiano, S. (1991). Influence of method of preparation on inclusion complexes of naproxen with different cyclodextrins. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, *17*(7), 943–957. <https://doi.org/10.3109/03639049109040831>
- Butler, M., Spearman, M., & Braasch, K. (2014). *Monitoring cell growth, viability, and apoptosis*. In Pörtner, R. (Ed.), *Animal Cell Biotechnology: methods and protocols*, 1104, 169-192. Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-733-4_12
- Cummings, B.S., Wills, L.P., & Schnellmann, R. G. (2004). Measurement of cell death in mammalian cells. *Current protocols in pharmacology*, 12. <https://doi.org/10.1002/0471141755.ph1208s25>
- Dale, E.J., Vermeulen, N.A., Juriček, M., Barnes, J.C., Young, R.M., Wasielewski, M.R., & Stoddart, J.F. (2016). Supramolecular Explorations: Exhibiting the Extent of Extended Cationic Cyclophanes. *Accounts of Chemical Research*, *49*(2), 262–273. <https://doi.org/10.1021/acs.accounts.5b00495>
- Gan, S.G., Krump, E., Shrode, L.D., & Grinstein, S. (1998). Loading pyranine via purinergic receptors or hypotonic stress for measurement of cytosolic pH by imaging. *American Journal of Physiology*, *275*(4), 1158–1166.

<https://doi.org/10.1152/ajpcell.1998.275.4.C1158>

- García, M.D., Alvarino, C., López-Vidal, E-M-, Rama, T., Peinador, C., & Quintela, J.M. (2014). Complexation of aromatic compounds with self-assembled PdII and PtII metallacycles. *Inorganica Chimica Acta*, 417, 27–37. <https://doi.org/10.1016/j.ica.2013.10.037>
- Harris, J.D., Moran, M.J., & Aprahamian, I. (2018). New molecular switch architectures. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(38), 9414–9422. <https://doi.org/10.1073/pnas.1714499115>
- Horváth S. (1980). Cytotoxicity of drugs and diverse chemical agents to cell cultures. *Toxicology*, 16(1), 59-66. [https://doi.org/10.1016/0300-483X\(80\)90110-9](https://doi.org/10.1016/0300-483X(80)90110-9)
- International Organization for Standardization. (2009). Biological evaluation of medical devices — Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity (ISO Standard No. 10993-5:2009). <https://www.iso.org/standard/36406.html>
- International Organization for Standardization. (2021). Standards. Recuperado 4 Junio 2021, de <https://www.iso.org/standards.html>
- Jurak, M., Wiącek, A.E., Ładniak, A., Przykaza, K., & Szafran, K. (2021). What affects the biocompatibility of polymers? *Advances in Colloid and Interface Science*. 294, 102451. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2021.102451>.
- Ma, X., & Zhao, Y. (2015). Biomedical applications of supramolecular systems based on Host-Guest interactions. *Chemical Reviews*, 115(15), 7794–7839. <https://doi.org/10.1021/cr500392w>
- Martínez Rodríguez, R., Gragera Martínez, R.R., Plumet Ortega, J., Martínez Murillo, R., & Capilla San Martín, J. (2008). *Fundamentos teóricos y prácticos de la histoquímica*. Consejo Superior de Investigaciones Científicas.
- National Institutes of Health, Office of Science Policy. (2018). *Significant research advances enabled by HeLa cells*. Recuperado 4 Junio 2021, de <https://osp.od.nih.gov/scientific-sharing/hela-cells-timeline/>
- Niles, A.L., Moravec, R.A., & Riss, T.L. (2009). In vitro viability and cytotoxicity testing and same-well multi-parametric combinations for high throughput screening. *Current chemical genomics*, 3, 33–41. <https://doi.org/10.2174/1875397300903010033>
- Odell, B., Reddington, M.V., Slawin, A.M.Z., Spencer, N., Stoddart, J.F., & Williams, D.J. (1988). Cyclobis(paraquat-p-phenylene): A tetracationic multipurpose receptor. *Angewandte Chemie International Edition*, 27(11), 1547–1550. <https://doi.org/10.1002/anie.198815471>
- Oliveira, T., Costa, I., Marinho, V., Carvalho, V., Uchôa, K., Ayres, C., Teixeira, S., & Vasconcelos, D.F.P. (2018). Human foreskin fibroblasts: from waste bag to important biomedical applications. *Journal of Clinical Urology*, 11(6), 385–394.

<https://doi.org/10.1177/2051415818761526>.

- Riss, T., Niles, A., Moravec, R., Karassina, N., & Vidugiriene, J. (2004a). *Cytotoxicity assays: in vitro methods to measure dead cells*. In Markossian, S., Sittampalam, G. S., Grossman, A., Brimacombe, K., Arkin, M., Auld, D., Austin, C. P., Baell, J., Caaveiro, J., Chung, T., Coussens, N. P., Dahlin, J.L., Devanaryan, V., Foley, T.L., Glicksman, M., Hall, M.D., Haas, J.V., Hoare, S., Inglese, J., Iversen, P.W., ... Xu, X. (Eds.), *Assay Guidance Manual* (pp. 1-15). Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK540958/pdf/Bookshelf_NBK540958.pdf
- Riss, T., Moravec, R., Niles, A., Duellman, S., Benink, H., Worzella, T., & Minor, L. (2004b). *Cell viability assays*. In Markossian, S., Sittampalam, G.S., Grossman, A., Brimacombe, K., Arkin, M., Auld, D., Austin, C.P., Baell, J., Caaveiro, J., Chung, T., Coussens, N.P., Dahlin, J.L., Devanaryan, V., Foley, T.L., Glicksman, M., Hall, M.D., Haas, J.V., Hoare, S., Inglese, J., Iversen, P.W., ... Xu, X. (Eds.), *Assay Guidance Manual* (pp. 1-25). Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065/pdf/Bookshelf_NBK144065.pdf
- Roche. (2021). *Cell Proliferation Reagent WST-1. Cat. No.: 05 015 944 001, 11 644 807 001* [Assay information]. Sigma-Aldrich. Recuperado 27 Mayo 2021, de <https://www.sigmaaldrich.com/deepweb/assets/sigmaaldrich/product/documents/350/519/cellprorobul.pdf>
- Sonawane, S.J., Kalhapure, R.S., & Govender, T. (2017). Hydrazone linkages in pH responsive drug delivery systems. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 99, 45–65. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2016.12.011>.
- Solini, A., Chiozzi, P., Morelli, A., Fellin, R., & Di Virgilio, F. (1999). Human primary fibroblasts in vitro express a purinergic P2X7 receptor coupled to ion fluxes, microvesicle formation and IL-6 release. *Journal of Cell Science*. 12(3), 297–305. <https://doi.org/10.1242/jcs.112.3.297>
- Steed, J.W., & Atwood, J.L. (2000). *Supramolecular Chemistry*. Wiley.
- Tatum, L.A., Su, X., & Aprahamian, I. (2014). Simple hydrazone building blocks for complicated functional materials. *Accounts of Chemical Research*, 47(7), 2141–2149. <https://doi.org/10.1021/ar500111f>
- ThermoFisher Scientific. (2015). Micro BCA Protein Assay Kit. Cat. No.: 23235 [Assay information]. Recuperado 27 Mayo 2021, de https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0011237_Micro_BCA_Protein_Asy_UG.pdf
- ThermoFisher Scientific. (2014). Pierce LDH Cytotoxicity Assay Kit. Cat. No.: 88953, 88954. [Assay information]. Recuperado 27 Mayo 2021, de https://assets.thermofisher.com/TFSAssets/LSG/manuals/MAN0011851_Pierce_LD

- Tian, B., Hua, S., & Liu, J. (2020). Cyclodextrin-based delivery systems for chemotherapeutic anticancer drugs: A review. *Carbohydrate Polymers*, 232, Article 115805. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115805>.
- Tiwari, G., Tiwari, R., Sriwastawa, B., Bhati, L., Pandey, S., Pandey, P., & Bannerjee, S. K. (2012). Drug delivery systems: An updated review. *International journal of pharmaceutical investigation*, 2(1), 2–11. <https://doi.org/10.4103/2230-973X.96920>
- Verma, G., Marella, A., Shaquiquzzaman, M., Akhtar, M., Ali, M.R., & Alam, M.M. (2014). A review exploring biological activities of hydrazones. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*, 6(2), 69–80. <https://doi.org/10.4103/0975-7406.129170>
- Zhang, J., & Ma, P.X. (2013). Cyclodextrin-based supramolecular systems for drug delivery: Recent progress and future perspective. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 65(9), 1215–1233. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2013.05.001>
- Zhang, X., Xu, X., Li, S., Li, L., Zhang, J., & Wang, R. (2019). A synthetic receptor as a specific antidote for paraquat poisoning. *Theranostics*, 9(3), 633–645. <https://doi.org/10.7150/thno.31485>

ANEXOS



Figura 11. Imagen de la placa de 96 pocillos sembrada con las líneas HFF-1 y HeLa

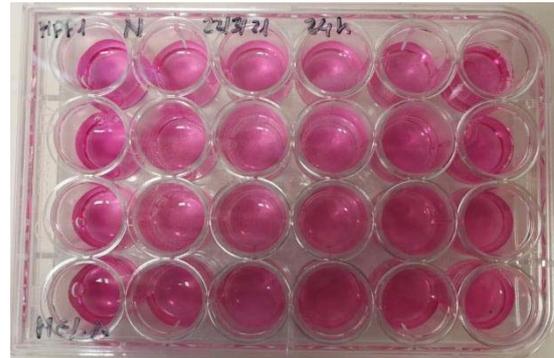


Figura 12. Imagen de la placa de 24 pocillos sembrada con las líneas HFF-1 y HeLa

Calibrado	
[BSA] (µg/mL)	Abs
0	0,0423
1	0,2313
2,5	0,2503
5	0,2947
10	0,3630
20	0,4880
40	0,6550

Tabla 2. Datos de la recta de calibrado del ensayo BCA

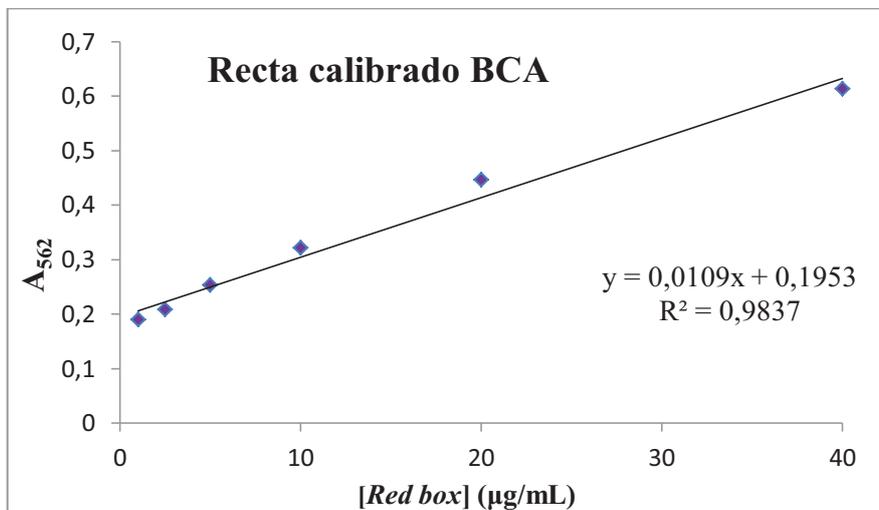


Figura 13. Representación de la recta de calibrado del ensayo BCA

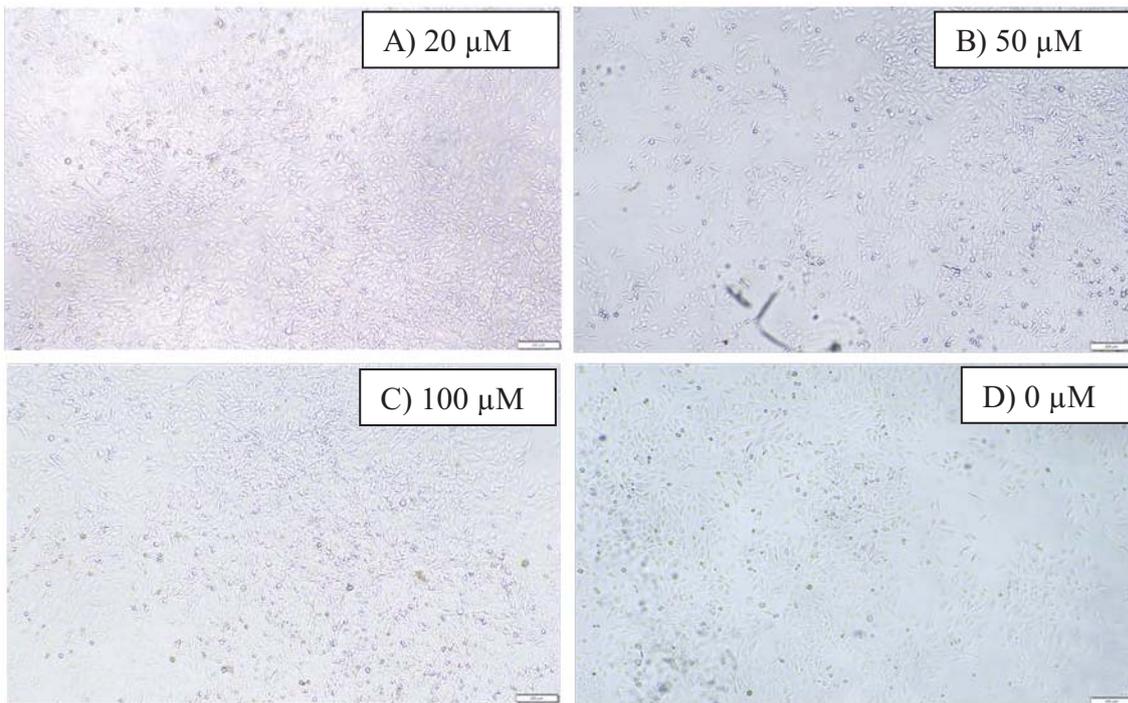


Figura 14. Imágenes al microscopio óptico (10X; barra=100 μm) de la apariencia de los cultivos de células HeLa tras 24 h de incubación con la red box a concentraciones de 20 μM (A), 50 μM (B), 100 μM (C) y 0 μM (control negativo de células sin tratar) (D)

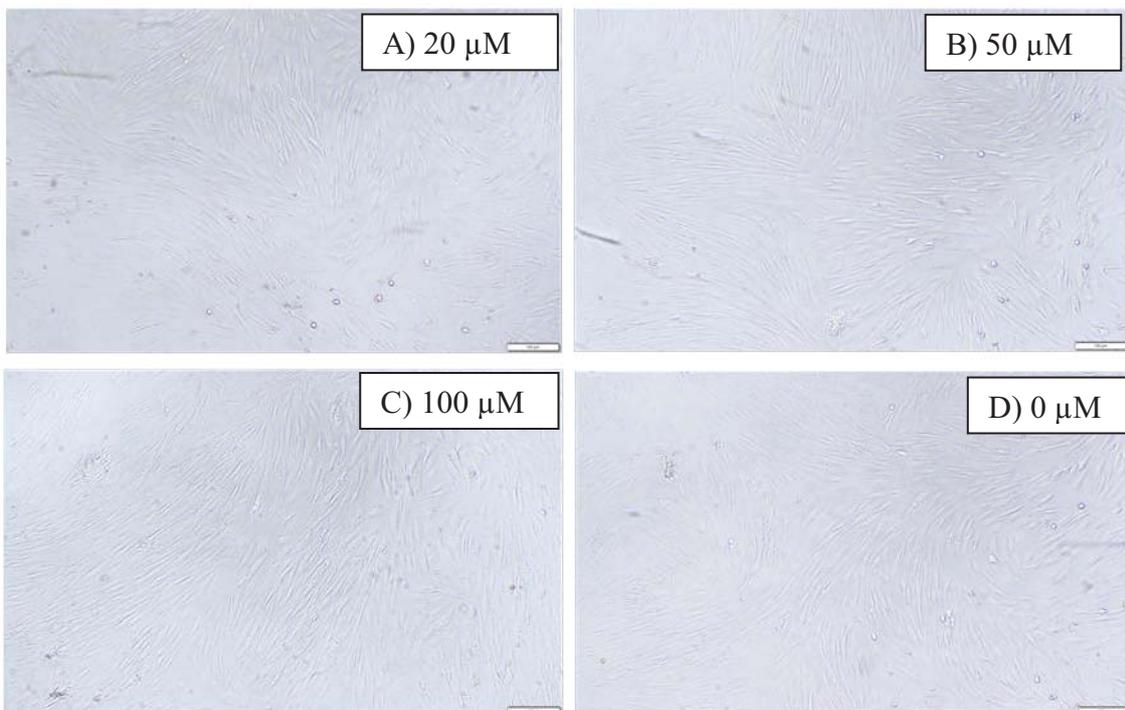


Figura 15. Imágenes al microscopio óptico (10X; barra=100 μm) de la apariencia de los cultivos de células HFF-1 tras 24 h de incubación con la red box a concentraciones de 20 μM (A), 50 μM (B), 100 μM (C) y 0 μM (control negativo de células sin tratar) (D)

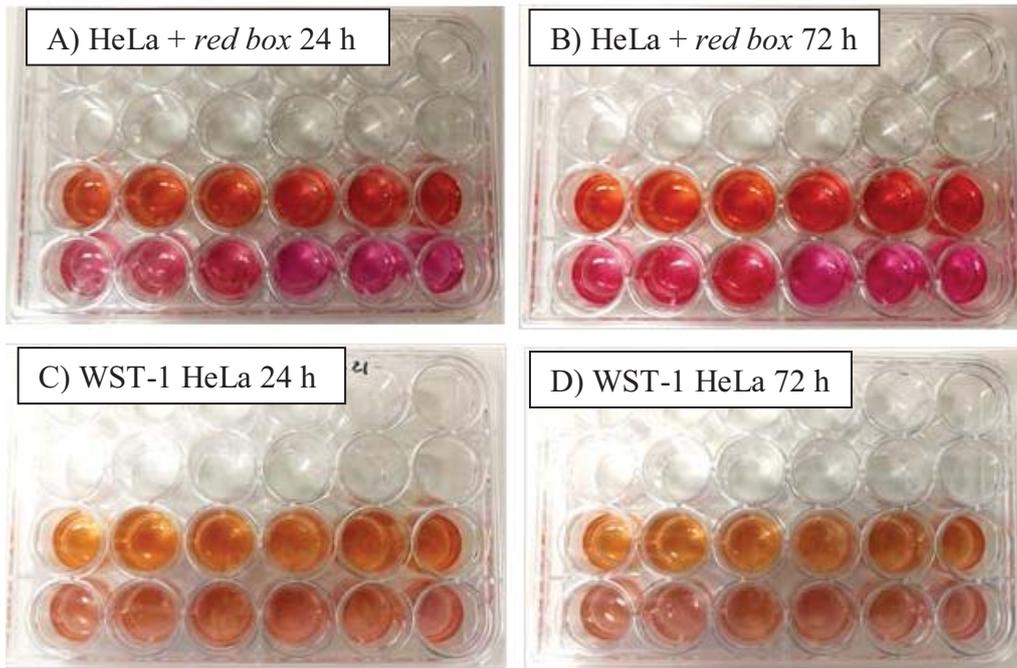


Figura 16. Imágenes de las placas sembradas con células Hela tras el tratamiento con red box tras 24 h (A) o 72 h (B) de incubación. Se muestran también las imágenes tras añadir el reactivo WST-1 a las placas correspondientes a las 24(C) y 72 h (D) de tratamiento con la red box

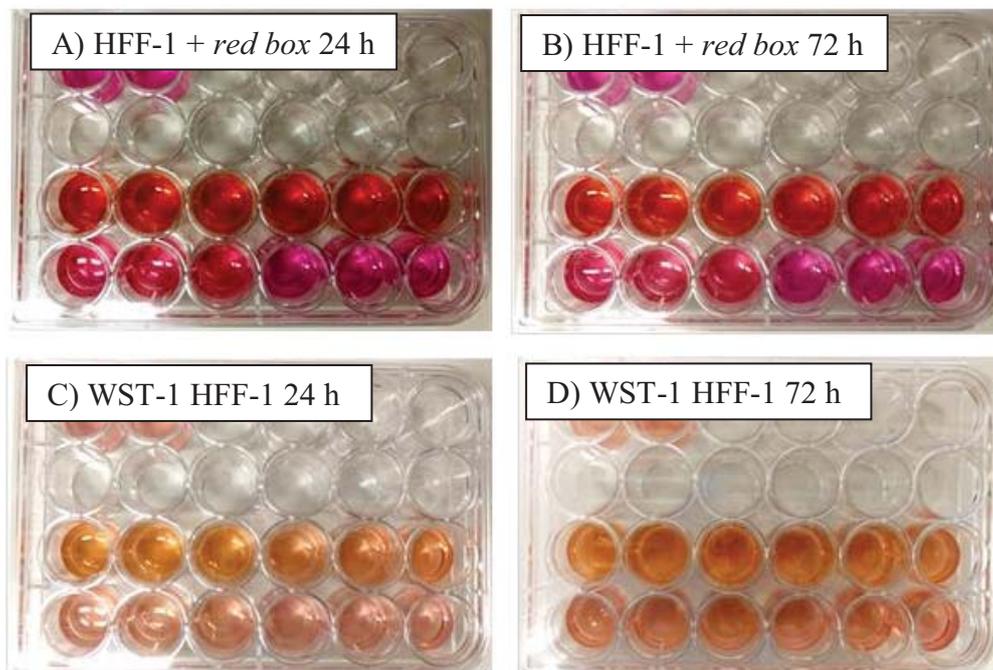


Figura 17. Imágenes de las placas sembradas con células HFF-1 tras el tratamiento con la red box tras 24 h (A) o 72 h (B) de incubación- Se muestran también las imágenes tras añadir el reactivo WST-1 a las placas correspondientes a las 24 (C) y 72 h (D) de tratamiento con la red box

Ensayo WST-1 (24 h)		
	HFF-1	HeLa
[Reb box] (μM)	% Viabilidad celular (Media \pm SD)	% Viabilidad celular (Media \pm SD)
0,05	74,22 \pm 5,30	92,99 \pm 4,07
1	68,26 \pm 4,80	102,74 \pm 15,31
5	72,63 \pm 15,35	92,51 \pm 20,45
10	61,64 \pm 7,52	90,12 \pm 14,06
20	66,70 \pm 10,78	86,52 \pm 15,12
50	69,35 \pm 4,26	92,82 \pm 7,06
100	66,35 \pm 8,82	90,64 \pm 16,02

Tabla 3. Resultados de viabilidad celular expresados como su valor medio \pm desviación típica (SD) obtenidos en el ensayo WST-1 en las células HFF-1 y HeLa, tras 24 h de incubación con la red box (Figura 7)

Ensayo WST-1 (24 h)						
p-valor ($\alpha=0,05$)						
0,05 μM	1 μM	5 μM	10 μM	20 μM	50 μM	100 μM
0,007	0,069	0,314	0,150	0,005	0,013	0,04

Tabla 4. Análisis estadístico de los resultados del ensayo WST-1 (Figura 7) en donde se muestran los p-valores (test t-Student; $\alpha=0,05$; a un nivel de confianza de 95 %) obtenidos tras comparar los valores medios del % viabilidad celular obtenidos a una misma concentración de red box en las líneas celulares HeLa y HFF-1. En rojo se muestran los datos en los que se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p < \alpha$)

Ensayo WST-1				
	HFF-1 24 h	HFF-1 72 h	HeLa 24 h	HeLa 72 h
[Reb box] (μM)	Proliferación (Media \pm SD)			
0	0,519 \pm 0,080	0,643 \pm 0,001	1,21 \pm 0,082	1,23 \pm 0,13
20	0,573 \pm 0,016	0,592 \pm 0,058	1,14 \pm 0,180	1,07 \pm 0,093
50	0,533 \pm 0,048	0,574 \pm 0,034	1,25 \pm 0,170	1,24 \pm 0,20
100	0,556 \pm 0,054	0,583 \pm 0,006	1,04 \pm 0,125	1,19 \pm 0,076

Tabla 5. Resultados de los datos de proliferación celular expresados como su valor medio \pm desviación típica (SD) medidos en el ensayo WST-1 en células HFF-1 y HeLa tras 24 y 72 h de incubación, en ausencia (0 μM) o presencia de la red box a las concentraciones indicadas (Figura 8A y 8B)

		Ensayo WST-1					
		p-valor HFF-1 ($\alpha=0,05$)			p-valor HeLa ($\alpha=0,05$)		
		20 μ M	50 μ M	100 μ M	20 μ M	50 μ M	100 μ M
24 h	C ⁻	0,216	0,412	0,339	0,332	0,403	0,014
72 h	C ⁻	0,164	0,038	0,001	0,121	0,455	0,334

Tabla 6. Análisis estadístico de los resultados del ensayo WST-1 en células HeLa y HFF-1 (Figuras 8A y 8B) en donde se muestran los p-valores (test t-Student; $\alpha=0,05$; a un nivel de confianza del 95 %) obtenidos tras comparar las medias de la proliferación celular en presencia de la red box con respecto a aquellas obtenidas en el control negativo de células sin tratar (C⁻). En rojo se muestran los datos en los que se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p<\alpha$)

Ensayo WST-1					
p-valor 24 h ($\alpha=0,05$)			p-valor 72 h ($\alpha=0,05$)		
20 - 20 μ M	50 - 50 μ M	100 - 100 μ M	20 - 20 μ M	50 - 50 μ M	100 - 100 μ M
0,317	0,219	0,238	0,324	0,476	0,079

Tabla 7. Análisis estadístico de los resultados del ensayo WST-1 en células HeLa y HFF-1 (Figuras 8A y 8B) en donde se muestran los p-valores (test t-Student; $\alpha=0,05$; a un nivel de confianza del 95 %) obtenidos tras comparar las medias de la proliferación celular obtenidas tras 24 y 72 h de incubación a una concentración de red box fija

Ensayo LDH				
	HFF-1 24 h	HFF-1 72 h	HeLa 24 h	HeLa 72 h
[Reb box] (μ M)	% Citotoxicidad (Media \pm SD)			
20	-41,82 \pm 4,39	-39,12 \pm 0,87	-40,8 \pm 0,51	-43,28 \pm 0,31
50	-4,73 \pm 2,52	-4,47 \pm 2,63	-13,86 \pm 0,62	-15,37 \pm 0,88
100	27,81 \pm 1,88	19,24 \pm 2,14	14,58 \pm 0,60	11,55 \pm 1,08

Tabla 8. Resultado de los datos de citotoxicidad celular expresados como su valor medio \pm desviación típica (SD) obtenidos en el ensayo LDH tras 24 y 72 h de incubación con la red box en células HFF-1 y HeLa (Figura 9A y 9B)

Ensayo WST-1	
p-valor HFF-1 ($\alpha=0,05$)	p-valor HeLa ($\alpha=0,05$)
100-100 μ M	100 - 100 μ M
0,032	0,038

Tabla 9. Análisis estadístico de los resultados del ensayo LDH en células HFF-1 y HeLa (Figuras 8A y 8B) en donde se muestran los p-valores (test t-Student; $\alpha=0,05$; a un nivel de confianza del 95 %) obtenidos tras comparar las medias del % citotoxicidad de la muestra de 100 μ M las 24 h y 72 h). En rojo se muestran los datos en los que se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p<\alpha$)

Ensayo de internalización celular			
24 h (pH 4)			
[Reb box] (μM)	[Reb box] (μM)	[Reb box] (ng/ μg)	% Internalización
20	0,199 \pm 0,125	0,323 \pm 0,275	0,995 \pm 0,625
50	-0,650 \pm 1,00	-1,18 \pm 1,85	-1,30 \pm 2,00
100	3,76 \pm 1,20	4,60 \pm 4,29	3,76 \pm 1,20

Tabla 10. Resultado del ensayo de internalización celular de la red box (media \pm desviación típica (SD)) medido a pH ácido (pH=4) tras 24 h de incubación en células HeLa (Figura 10A)

Ensayo de internalización celular			
72 h (pH 4)			
[Reb box] (μM)	[Reb box] (μM)	[Reb box] (ng/ μg)	% Internalización
20	1,81 \pm 0,533	2,31 \pm 0,904	9,03 \pm 2,67
50	2,12 \pm 0,799	2,90 \pm 1,19	4,24 \pm 1,60
100	-0,868 \pm 2,12	-1,05 \pm 3,53	-0,868 \pm 2,12

Tabla 11. Resultado del ensayo de internalización celular de la red box (media \pm desviación típica (SD)) medido a pH ácido (pH=4) tras 72 h de incubación en células HeLa (Figura 10A)

Ensayo de internalización celular			
24 h (pH 11)			
[Reb box] (μM)	[Reb box] (μM)	[Reb box] (ng/ μg)	% Internalización
20	0,0432 \pm 0,429	0,161 \pm 0,688	0,215 \pm 2,15
50	4,02 \pm 1,86	7,38 \pm 3,58	8,04 \pm 3,73
100	8,25 \pm 5,67	15,97 \pm 13,28	8,25 \pm 5,67

Tabla 12. Resultado del ensayo de internalización celular de la red box (media \pm desviación típica (SD)) medido a pH básico (pH=11) tras 24 h de incubación en células HeLa (Figura 10B)

Ensayo de internalización celular			
72 h (pH 11)			
[Reb box] (μM)	[Reb box] (μM)	[Reb box] (ng/ μg)	% Internalización
20	-3,29 \pm 2,50	-3,95 \pm 2,99	-16,46 \pm 12,50
50	4,17 \pm 4,11	4,95 \pm 3,79	8,33 \pm 4,11
100	1,57 \pm 2,40	3,29 \pm 5,12	1,57 \pm 2,40

Tabla 13. Resultado del ensayo de internalización celular de la red box (media \pm desviación típica (SD)) medido a pH básico (pH=11) tras 72 h de incubación en células HeLa (Figura 10B)