

**UNIVERSIDAD DE LA FRONTERA
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y FORESTALES**



**NANOPARTICULAS MODIFICADAS CON COBRE EN EL TRATAMIENTO DEL
CANCER**

Tesis presentada a la Facultad de Ciencias Agropecuarias y Forestales de la Universidad de La Frontera. Como parte de los requisitos para optar al título de Biotecnólogo.

FERNANDO ENRIQUE JARA JARA

TEMUCO – CHILE
2012

**UNIVERSIDAD DE LA FRONTERA
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y FORESTALES**



**NANOPARTICULAS MODIFICADAS CON COBRE EN EL TRATAMIENTO DEL
CANCER**

Tesis presentada a la Facultad de Ciencias Agropecuarias y Forestales de la Universidad de La Frontera. Como parte de los requisitos para optar al título de Biotecnólogo.

**FERNANDO ENRIQUE JARA JARA
ENRIQUE ERASMO MONTIEL-EULEFI**

**TEMUCO – CHILE
2012**

NANOPARTICULAS MODIFICADAS CON COBRE EN EL TRATAMIENTO DEL CANCER

PROFESOR GUIA:

ENRIQUE ERASMO MONTIEL EULEFI
DR. EN BIOQUIMICA, BIOLOGIA
MOLECULAR Y BIOMEDICINA.
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS
BASICAS, FACULTAD DE MEDICINA,
UNIVERSIDAD DE LA FRONTERA.

PROFESORES CONSEJEROS:

CLAUDIO ANDRES TORO AEDO
INGENIERO CIVIL INDUSTRIAL
MENSION EN AGROINDUSTRIAS.
DR. INGENIERIA QUIMICA.
DIRECTOR EJECUTIVO CENTRO DE
INVESTIGACION DE POLIMEROS
AVANZADOS, CIPA.

CALIFICACION PROMEDIO TESIS:

INDICE

Capítulo		Página
I	INTRODUCCION	1
II	REVISION BIBLIOGRAFICA	3
2.1	Cáncer	3
2.1.1	Factores Causales	4
2.1.2	Síntomas	5
2.1.3	Cáncer Gástrico	6
2.2	Sistemas Nanoparticulados	7
2.2.1	Nanopartículas de Acido Poli-Láctico	8
2.3	Cobre	10
2.4	Cultivos Celulares	12
III	MATERIALES Y METODOS	14
3.1	Líneas Celulares	14
3.1.1	Condiciones del cultivo celular	14
3.2	Elaboración de Nanopartículas	14
3.3	Evaluación de citotoxicidad por YO-PRO-1/IP	15
3.4	Análisis de Ciclo celular por PI	17
3.5	Ensayo de MTT	18
3.6	Análisis Estadístico	19
IV	PRESENTACION DE RESULTADOS Y DISCUSION	20
4.1	Síntesis y caracterización de Nanopartículas	20
4.2	Evaluación de citotoxicidad por cobre	22
4.3	Evaluación de citotoxicidad por Ac. Láctico	24
4.4	Evaluación de citotoxicidad por nanopartículas con cobre	26
4.5	Análisis de ciclo celular	31
4.6	Evaluación de citotoxicidad por MTT	36
V	CONCLUSIONES	38

VI	RESUMEN	40
VII	SUMMARY	41
VIII	LITERATURA CITADA	42
X	ANEXOS	47

I. INTRODUCCION

A pesar de los esfuerzos realizados en el área de la oncología, el cáncer se mantiene como una de las enfermedades que provoca mayor número de muertes en el mundo. Los tratamientos actuales contra esta patología van desde la radioterapia y cirugía; utilizadas para tratar un tumor localizado, y la quimioterapia, que es principalmente utilizada en el caso de metástasis. Sin embargo, la mayor limitación de los actuales tratamientos está dada por el daño a los tejidos normales debido a las altas dosis que son requeridas para erradicar las células cancerígenas.

Es por esto que el uso de compuestos nanoparticulados a base de polímeros sintéticos como el ácido poli-láctico (PLA) se ha convertido en una importante área de interés científico debido a la capacidad que poseen para liberar una amplia variedad de moléculas. Estos sistemas minimizan la degradación del principio activo encapsulado, incrementan la vida media de la droga, además de reducir la toxicidad de ésta.

Por su parte el cobre y los complejos que éste forma con otras moléculas, han sido investigados por numerosos autores como un posible agente anticancerígeno, ya que las células de cáncer serían más propensas a su absorción, lo cual induciría un efecto citotóxico, provocando su muerte.

En la presente investigación, se sintetizaron nanoparticulas de ácido poli-láctico (Nano-PLA) y nanoparticulas cargadas con cobre (Nano-Cu) con el fin de evaluar la citotoxicidad que presenta estos sistemas nanoparticulados sobre las células cancerígenas MKN correspondiente a cáncer gástrico, además de evaluar los efectos que se producen en una línea endotelial no cancerígena humana, HuVEC, esto permite determinar los efectos que se producen en ambas líneas celulares, además de permitir la comparación entre las células cancerígenas y normales.

Esta investigación está enmarcada en el Proyecto PIA: DI 10-7003.

Hipótesis:

H1: Las nanopartículas con cobre (Nano-Cu) aumentan la citotoxicidad de células cancerígenas.

Objetivo General

- Determinar el efecto citotóxico de las nanopartículas de PLA y PLA cargadas con cobre en células cancerígenas (MKN).

Objetivos Específicos

- Sintetizar y caracterizar nanopartículas de PLA y PLA cargadas con cobre.
- Evaluar la citotoxicidad con YOPRO-1/IP en células cancerígenas y normales tratadas con nanopartículas, AL, PLA y Cu.
- Evaluar los estados del ciclo celular en células cancerígenas y normales tratadas con nanopartículas, AL, PLA y Cu.
- Evaluar mediante MTT el efecto en la proliferación de células cancerígenas bajo los tratamientos con nanopartículas, AL, PLA y Cu.

II. REVISION BIBLIOGRAFICA

2.1 Cáncer

El cáncer, es un término genérico para la determinación de un grupo de más de 100 enfermedades que pueden afectar a cualquier tipo celular del organismo. Se desarrolla a partir de la acumulación y selección sucesiva de alteraciones genéticas y epigenéticas, que permiten a las células sobrevivir, replicarse y evadir mecanismos reguladores de apoptosis, proliferación y de ciclo celular (Willingham *et al.*, 2004).

Los mecanismos responsables de mantener y reparar el DNA pueden verse afectados por mutaciones (Valko *et al.*, 2004), las cuales pueden ser hereditarias o esporádicas. Estas mutaciones pueden provocarse por sustitución, adición o delección de uno o más nucleótidos, alterando la fisiología celular induciendo a la transformación de las células (Dey *et al.*, 2004). Varios oncogenes, incluyendo ras, myc, fos y c-fms, pueden ser activados por mutaciones puntuales que provocan sustituciones críticas en los aminoácidos, provocando cambios en la traducción proteica.

El descubrimiento de que los retrovirus eran capaces de producir tumores, surgió de la observación de que el desarrollo del tumor era el resultado de la presencia de oncogenes virales dentro del genoma celular. Al mismo tiempo se observó que el DNA de varios tumores humanos difería del tejido no tumoral, y que el elemento responsable de la transformación maligna podría inducirse en células normales. La homología del oncogén viral al oncogén celular fue establecida mediante una investigación en el virus del sarcoma de Rous y el gen src, responsable de tumor en pollos (Stehelin *et al.*, 1976); desde entonces varios oncogenes han sido descubiertos. Además, se demostró que los oncogenes celulares activados existen como proto-oncogenes y que su mutación o expresión anormal conduce a la transformación maligna.

Los proto-oncogenes son un grupo de genes que al estar mutados transforman las células normales en cancerígenas (Weinstein *et al.*, 2006). Las mutaciones en proto-oncogenes son normalmente dominantes, y a esta versión mutada del se le conoce como oncogén.

Algunos proto-oncogenes codifican para proteínas cuyas funciones son de vital importancia en el normal desarrollo humano. Por otro lado, los oncogenes exhiben una elevada producción de estas proteínas llevando a las células a aumentar su proliferación, disminuir la diferenciación celular e inhibir la muerte celular, provocando cáncer.

2.1.1 Factores Causales

La transformación de una célula normal a una tumoral es un proceso que abarca varias fases y suele consistir en una progresión de una lesión pre-cancerosa a un tumor maligno. Esas modificaciones son resultado de la interacción entre los factores genéticos de una persona y tres categorías de agentes exteriores:

- Carcinógenos Físicos: como la luz ultravioleta y la radiación ionizante.
- Carcinógenos Químicos: como el asbesto y el humo del tabaco.
- Carcinógenos Biológicos: como las infecciones por virus, bacterias o parásitos.

El envejecimiento es otro factor fundamental en el desarrollo de cáncer. La incidencia de cáncer aumenta con la edad muy probablemente porque con la edad aumenta también la acumulación de factores de riesgo de tipos específicos de cáncer. La acumulación general de factores de riesgo se combina con la disminución en la eficiencia de los mecanismos de reparación celular.

2.1.2 Síntomas

Los síntomas del cáncer dependen del tipo de tumor y de su ubicación en el cuerpo. Por ejemplo, el cáncer de pulmón puede provocar tos, dificultad respiratoria o dolor en el pecho (Watanabe *et al.*, 2011); mientras que el cáncer gástrico frecuentemente ocasiona indigestión, dolor abdominal, pérdida de peso, etc. Cualquiera de estos síntomas puede ser causado por cáncer o por otros problemas de salud menos serios, tales como un virus estomacal o una úlcera, de ahí su difícil detección. Otros tipos de cánceres, en cambio, pueden ser totalmente asintomáticos y en otros, como el cáncer de la vesícula biliar, los síntomas no se presentan hasta que la enfermedad haya alcanzado una etapa avanzada.

El modelo clásico de desarrollo tumoral divide el proceso en tres fases: iniciación, promoción y progresión. La iniciación es el proceso por el cual un daño crítico del DNA se hace permanente en la célula, debido a que ésta se divide antes de que se repare, o bien por un fallo en el proceso de reparación. La promoción se define como el proceso mediante el cual se cree que determinados sucesos epigenéticos influyen de forma selectiva en la proliferación de las células iniciadas, mientras que la progresión implica la producción de cambios hereditarios más profundos que aparecen a medida que la población celular se divide y desarrolla el cáncer.

La mayoría de las mutaciones en las células cancerígenas son somáticas, por lo que solamente se encuentran en las células del tumor. Sin embargo, alrededor del 1% de todos los cánceres se producen en individuos portadores de una mutación identificada en la línea germinal de cada célula de su cuerpo.

La inactivación de los genes supresores tumorales puede suceder por mutación o por delección. El análisis de regiones del cromosoma 13 eliminadas de forma congénita que se asociaban al retinoblastoma hereditario dio lugar al desarrollo de modelo de doble impacto de la carcinogénesis, por el cual se postuló que en determinados genes era necesario que estuvieran

inactivados ambos alelos para que se produjera la génesis del tumor. Esta inactivación de ambos alelos se produce a menudo mediante un proceso conocido como pérdida de heterocigosidad.

2.1.3 Cáncer Gástrico

El cáncer de estómago o también conocido como cáncer gástrico, corresponde a un tipo de crecimiento tisular maligno producido por la proliferación descontrolada de células anormales con capacidad de invasión y destrucción de otros tejidos y órganos, en particular el intestino delgado y el esófago, causando cerca de un millón de muertes en el mundo anualmente; es la neoplasia más común en el Sudeste Asiático y es la segunda causa de muerte por cáncer a nivel mundial (Kim *et al.*, 2010; Yao *et al.*, 2011).

En nuestro país, el cáncer gástrico representa la primera causa de muerte por tumores malignos para ambos sexos. La tasa de mortalidad ha estado declinando en la gran mayoría de los países del mundo. Similar fenómeno había ocurrido en Chile hasta comienzos de los ochenta, fecha desde la cual se ha estabilizado, manteniendo su tasa cruda en torno a 20 por 100.000 habitantes. En Chile, fallecen alrededor de 3.000 personas al año por esta causa. Dentro del país, existen regiones de alta mortalidad (Araucanía, Bío Bío), otras de mortalidad intermedia (Zona central), y algunas de baja mortalidad (Arica, Antofagasta) (Csende *et al.*, 1992).

Las células tumorales asociadas a esta patología, pueden invaden los vasos linfáticos de los tejidos adyacentes, penetrando en la circulación sanguínea, después de lo cual queda abierto virtualmente el camino a cualquier órgano del cuerpo generando metástasis. El desarrollo de metástasis, continúa siendo el mayor obstáculo en la terapia del cáncer y la causa más importante en la muerte por esta enfermedad (Yang *et al.*, 2008). La metástasis ocurre en el 85% de los individuos con cáncer gástrico, con un promedio de supervivencia de cinco años en un 75% de aquellos diagnosticados en estados tempranos y menos de 30% en aquellos con estados tardíos.

2.2 Sistemas Nanoparticulados

En los últimos años, se han realizado importantes esfuerzos con el fin de mejorar las terapias contra el cáncer, principalmente mediante la utilización de polímeros conjugados, microesferas y nanopartículas.

La utilización de nanopartículas es una importante área de investigación en el campo de la liberación controlada de fármacos, ya que estos sistemas permiten destinar una amplia variedad de moléculas a distintos tejidos liberándolos de manera sostenida en el tiempo. Además, el uso de nanopartículas minimiza la degradación del principio activo, incrementa su vida media en el interior del órgano a tratar y disminuye la toxicidad de éste (Jain *et al.*, 2005; Singh *et al.*, 2005).

En las últimas tres décadas, se han realizado notables adelantos en el campo de la nanotecnología, mayoritariamente en el uso de polímeros sintéticos, ya que estos a diferencia de los polímeros naturales, poseen mayor biodegradabilidad y biocompatibilidad (Lee *et al.*, 2007). Entre los polímeros sintéticos utilizados se encuentran principalmente el ácido poli-láctico (PLA) y un copolímero formado por ácido poli-láctico y glicólico (PLGA), ambos aprobados por la FDA (Food and Drug Administration) para elaboración de sistemas de liberación de fármacos en humanos (Zille *et al.*, 2010) y otros usos biomédicos como la fabricación de suturas biodegradables (Jain *et al.*, 2000; Thomas *et al.*, 2004). El polímero utilizado para sintetizar nanopartículas, afecta de manera importante a las propiedades y estructura de las partículas y además determina sus posibles aplicaciones, y la vía por la cual es administrada (Pinto Reis *et al.*, 2006).

Entre las distintas moléculas encapsuladas en nanopartículas se encuentran fármacos antitumorales (Mo *et al.*, 2005; Derakhshandeh *et al.*, 2007; Kang *et al.*, 2008; Mattheolabakis *et al.*, 2008), antígenos (Lecaroz *et al.*, 2006), proteínas (Lutsiak *et al.*, 2006; Cui *et al.*, 2007; Kumar *et al.*, 2007), etc.

El tamaño de las nanopartículas parece ser un tema importante para que estas puedan ejercer su función; así lo demostró Schadlich *et al.*, (2011), quien indica que las nanopartículas entre 111 y 141nm de diámetro se acumulan eficientemente en el tejido tumoral, mientras que partículas de mayor tamaño son rápidamente eliminadas por el hígado. Así mismo, Yu *et al.*, (2007), indica también que la constante administración de nanopartículas de PLA, ha resultado en la acumulación de nanopartículas en los tumores.

2.2.1 Nanopartículas de Acido Poli-Láctico (PLA)

El ácido poli-láctico, es el producto de la esterificación del ácido láctico (Fig. 1) (Duan *et al.*, 2005), el cual es una de las moléculas quirales más simples. Se encuentra presente en el citoplasma celular en el proceso de respiración anaeróbica (Fermentación Láctica), donde el ácido pirúvico obtenido a partir de la glucólisis se transforma en ácido láctico (Fig. 2).

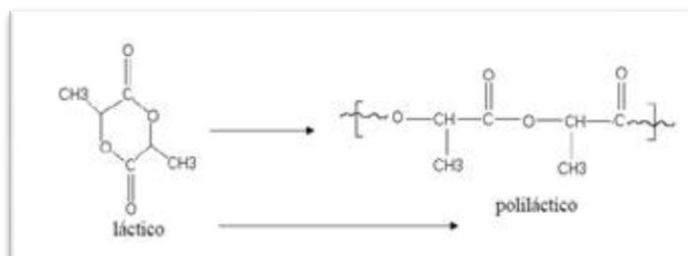


Figura 1: Esterificación de Ac. Láctico para formar Ac. Poli-láctico (PLA).

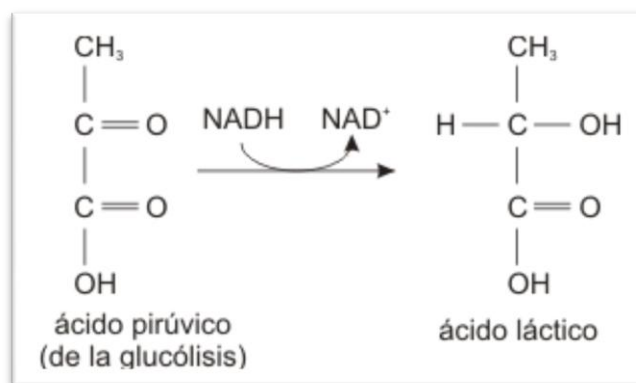


Figura 2: Formación de ácido láctico a partir de ácido pirúvico por reducción de NADH.

El ácido láctico es posible encontrarlo como dos isómeros, el D y L (Fig. 3), siendo el último el que se presenta casi exclusivamente en la fermentación láctica (Lunt *et al.*, 1997). La diferencia entre ambos enantiómeros, está dada por el efecto que se produce sobre la luz polarizada. En el caso del ácido L-láctico, el plano se gira en sentido horario, mientras que la isoforma D gira el plano en un sentido contrario.

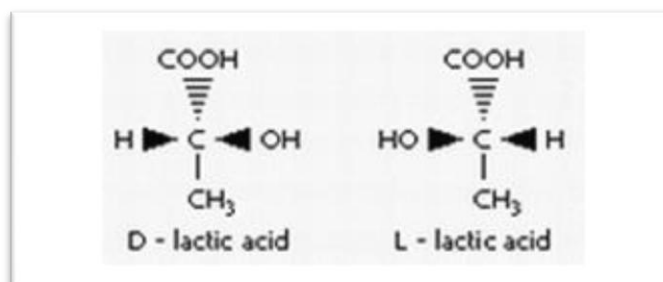


Figura 3: Se muestran los dos enantiómeros existentes para el Ac. Láctico.

Entre los poliésteres utilizados en el desarrollo de nanopartículas destacan los poliésteres alifáticos, formados por una sucesión, bien de unidades monoméricas de ácido láctico o por dímeros compuestos por ácido láctico y glicólico. El L-PLA y el PLGA son compuestos que corresponden respectivamente al homopolímero lineal del ácido poli-L-láctico y a co-polímeros

lineales del D,L ácido láctico y glicólico, los cuales se pueden encontrar en proporciones monoméricas variables.

Las nanopartículas de PLA han sido utilizadas masivamente en terapias contra el cáncer, es así como Yang *et al.*, (2011), desarrolló nanopartículas de PLA-PEG (Poli etilenglicol) cargadas con un RNA interferencia (siRNA), las cuales fueron internalizadas por las células cancerígenas HepG2 y MDA-MB-435s logrando silenciar el gen Plk1, generando la inducción del proceso apoptótico. Por otra parte, Cirstoiu-Hapca *et al.*, (2007), indica que el recubrimiento de la superficie de las nanopartículas con ciertos ligandos específicos para determinados tejidos diana, podrían ser útiles en terapias contra el cáncer.

El ácido láctico es la molécula primordial para la formación de nanopartículas de PLA, sin embargo, se ha demostrado que posee una actividad proliferativa en células cancerígenas, incluso generando metástasis in-vivo al aumentar la expresión de genes transcripcionales asociados a células madre, generando un descenso significativo en la sobrevivencia (Martinez-Outschoorn *et al.*, 2011).

2.3 Cobre

El cobre es un elemento traza esencial para todos los organismos vivos ya que permite el desarrollo de variadas funciones biológicas (Tisato *et al.*, 2010; Espinoza *et al.*, 2011) tales como el desarrollo del organismo, función inmunitaria, procesos de neo-vascularización, mantenimiento de la función neuroendocrina y el metabolismo del fierro (Harris *et al.*, 1997).

Después del hierro y el zinc, el cobre es el mineral más abundante de nuestro organismo. Los requerimientos en adultos oscilan entre 1,2 - 1,5 mg/día en caso de dietas normales. Aún así, nuestro organismo puede tolerar 3mg/día o más durante largos períodos de tiempo y hasta 8 - 10 mg/día durante varios meses.

El metabolismo del cobre, está regulado por diversos transportadores y proteínas chaperonas (Furukawa *et al.*, 2008). Desde las levaduras hasta los humanos, el cobre es captado por las células a través de una familia de proteínas transportadoras altamente conservadas denominadas CTR (*copper transporters*) (Zhou *et al.*, 1997). En humanos existen dos CTR principales (CTR-1 y CTR-2). La proteína CTR-1 es la principal proteína funcional, mientras que en el caso de CTR-2, se sabe que su mRNA se expresa de manera constitutiva aunque su función no está totalmente dilucidada, sin embargo se propone que también está relacionado con la absorción de cobre por parte de la célula (Blair *et al.*, 2009).

Estos transportadores, se encuentran regulados de manera que si las concentraciones extracelulares de cobre son muy elevadas, los niveles de CTR-1 disminuyen de la superficie celular por auto-degradación (Petris *et al.*, 2003).

Luego de atravesar la membrana plasmática, los iones de cobre son transportados al compartimento secretor, a la mitocondria, y a cuproenzimas citosólicas por medio de las chaperonas Cox 17, Atox-1 y CCS respectivamente. Cox 17 transporta los iones cobre hacia proteínas mitocondriales (SCO1 y SCO2), las cuales los incorporan en la citocromo-c-oxidasa de la cadena respiratoria (Bertinato *et al.*, 2004). Por otro lado, Atox-1 transfiere estos iones metálicos hacia las ATPasas encargadas de exportarlo (ATP7A y ATP7B), mientras que el complejo formado por Cu-Atox actúa como factor de transcripción uniéndose a la región promotora del gen que codifica para la ciclina D (Muller *et al.*, 2009). Finalmente, las proteínas CCS le ceden los iones Cu a la enzima superóxido Dismutasa Cu/Zn dependiente (Cu/ZnSOD) (Caruano *et al.*, 2006).

La búsqueda de nuevas drogas antitumorales a base de metales, incluye la investigación de la actividad citotóxica que puede presentar el cobre, especialmente el cobre de naturaleza hidrofílica debido a su capacidad citotóxica in-vitro.

La evidencia de que los complejos de cobre poseen actividad citotóxica, viene desde los años 60 (Marzano *et al.*, 2009). Desde ahí en adelante, variadas investigaciones han propuesto la utilización de estos complejos como una posible terapia frente al cáncer (Brewer *et al.*, 2000; Huang *et al.*, 2005; Ding *et al.*, 2009). Thati *et al.*, (2007), describió que los complejo de cobre muestran actividad anti-proliferativa en células de cáncer renal A-498 y de cáncer hepático HepG2, mientras que las células hepáticas no cancerígenas (CHANG) se muestran menos sensitivas a esta actividad. Por otro lado, Zheng *et al.*, (2010), comprobó que la N-Acetil-cisteína, una molécula que se une a compuestos metálicos, mostró una actividad apoptótica cuando se unía con cobre, mientras que esta actividad no se mostraba al estar unido a zinc o fierro. Esta habilidad, se encuentra principalmente relacionada con la inducción del estrés oxidativo (Tardito *et al.*, 2009).

2.4 Cultivos Celulares

Los cultivos celulares son el producto de la recolección de células, colocadas en condiciones ideales para su sobrevivencia y multiplicación, manteniendo las funciones metabólicas semejantes a las que tenía en el organismo vivo.

Los cultivos de células animales se clasifican dependiendo de su capacidad de adherencia a la matriz donde son cultivadas, así como si han sido aisladas recientemente o si proceden de células modificadas. De acuerdo a su capacidad de adherencia, los cultivos pueden proliferar creando monocapas o pueden estar suspendidos en el medio, lo que está asociado con el tipo de célula de la cual derivan; generalmente, las células derivadas de órganos, crecen en monocapa, aunque también existen células como las HeLa, que son capaces de crecer tanto en monocapas como en suspensión.

Cuando el cultivo proviene de células que han sido disgregadas a partir de un órgano de un animal recién sacrificado reciben el nombre de Cultivo Primario; mientras que cuando éste

cultivo primario es sometido a procesos de transformación que le confiere una ilimitada capacidad de multiplicación, adoptan el nombre de Líneas Celulares.

Para el caso de nuestra investigación, se utilizaron las líneas celulares HuVEC, correspondiente a una línea endotelial humana no cancerígena y la línea MKN, obtenida a partir de cáncer gástrico humano que se caracteriza por provocar altos grados de metástasis (Takikawa et al., 2006).

III. MATERIALES Y METODOS

3.1. Líneas Celulares

Las líneas celulares utilizadas para la investigación, corresponden a la línea cancerígena MKN de cáncer gástrico, y como control la línea endotelial humana no cancerígena HuVEC. Ambas fueron obtenidas a partir del Centro de Biotecnología de la Reproducción (CEBIOR), perteneciente a la Universidad de La Frontera.

3.1.1 Condiciones del cultivo celular

Ambas líneas celulares, HuVEC y MKN fueron cultivadas en placas (Orange Scientific) de 60 y 100mm con medio DMEM y RPMI respectivamente (Caisson Labs), suplementado con suero fetal bovino (FBS) al 10%, PSA (anfotericina B, estreptomycin y penicilina) al 1%, y piruvato [1mM]. Fueron incubadas con 95% de humedad y 5% de CO₂ a 37°C en el laboratorio de cultivo celular ubicado en el Núcleo de Desarrollo Científico Tecnológico (BIOREN) de la Universidad de La Frontera.

3.2. Elaboración de Nanopartículas

La preparación de las nanopartículas cargadas con cobre, fue realizada usando la técnica de doble emulsión (w/o/w) descrita por Avgoustakis *et al.*, (2002). Se disolvieron 100mg de PLA (Sigma Aldrich - 38 534-5G) en 2mL de Diclorometano (Merck), luego se agregaron 0,4mL de sulfato de cobre (CuSO₄, 20 mg/mL) a la solución, la cual posteriormente fue sonicada a 10W por 45 segundos permitiendo la formación de la primera emulsión (w/o). Luego, se agregaron 6mL de Dodecilsulfato sódico (SDS) [12Mm] (U.S. Biological - 55 010), y se realizó una segunda sonicación, esta vez a 18W durante un minuto para formar la doble emulsión (w/o/w).

Esta solución, fue colocada en un agitador durante toda la noche para permitir la evaporación del solvente (Fig. 4), y luego se realizó la purificación de las nanopartículas aplicando dos ciclos de centrifugación de 30 minutos a 43370g para posteriormente resuspender en agua desionizada estéril (ADESI). Además, también se sintetizaron nanopartículas sin cobre, las cuales fueron obtenidas mediante el mismo protocolo, reemplazando el volumen de cobre por agua desionizada estéril.

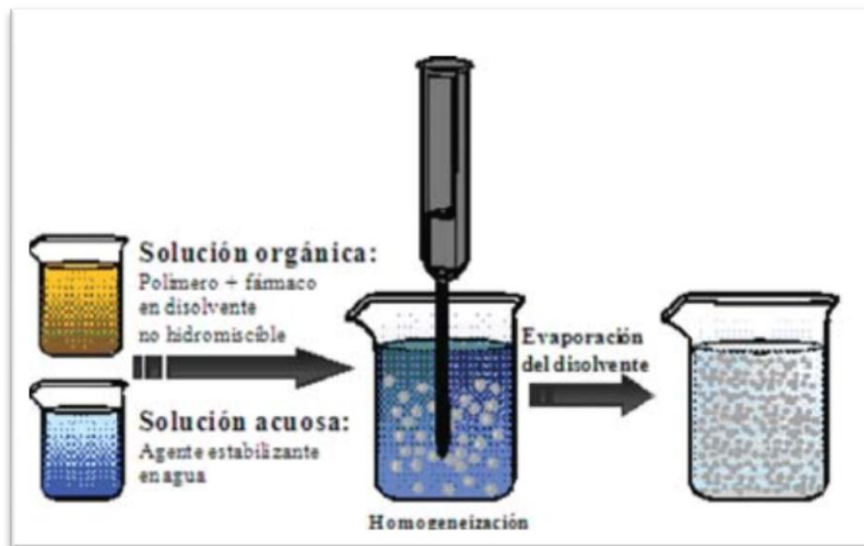


Figura 4: Imagen esquemática sobre el procedimiento de preparación de nanopartículas de PLA.

La caracterización de las nanopartículas se realizó por medio de microscopía electrónica de transmisión, en la Universidad de Concepción.

3.3. Evaluación de citotoxicidad por YO-PRO-1/IP

Con el fin de diferenciar la apoptosis y necrosis celular, se utilizó el kit *Membrane Permeability/Dead Cell Apoptosis Kit with YO-PRO®-1 and PI for Flow Cytometry* de Invitrogen.

El compuesto denominado YO-PRO-1, permite marcar la molécula de DNA sin que la célula presente permeabilización, ya que pasa a través de la membrana plasmática de las células apoptóticas marcándola con una fluorescencia de color verde para ser leída en microscopio de fluorescencia o por citometría de flujo. En el caso de Ioduro de Propidio (PI), se trata de un fluoróforo mutagénico que tiene la capacidad de intercalarse con el DNA de células permeabilizadas. Su detección es posible mediante la visualización de fluorescencia de color rojo.

Para este experimento, se utilizaron las líneas celulares HuVEC, la cual fue cultivada en placas de 60mm con 3mL de medio DMEM y la línea MKN cultivada con medio RPMI. Los cultivos fueron expuestos durante 24 horas a 3 concentraciones distintas de cobre (1mM, 10mM, 40mM) y 5 concentraciones diferentes de ácido láctico (0,1mM, 1mM, 10mM, 100mM, 1M). Luego de cumplidas las 24 horas de tratamiento, el cultivo fue lavado dos veces con 1mL de buffer fosfato salino (PBS), para luego agregar 1mL de tripsina a cada placa para permitir la liberación de las células desde la matriz. Las células fueron colocadas en tubos eppendorf donde se realizó una centrifugación de 5 minutos a 3000rpm; se eliminó el sobrenadante para posteriormente agregar 1mL of PBS, 1µL YOPRO-1, 1µL de ioduro de propidio (IP) a cada tubo. Se efectuó una incubación en hielo durante 30 minutos en oscuridad, para posteriormente efectuar una nueva centrifugación por 5 minutos a 3000rpm para remover el sobrenadante; finalmente, se agregó 1mL de PBS por cada tubo y se procedió a analizar las muestras por medio de citometría de flujo.

Además, se realizaron ensayos de citotoxicidad con nanopartículas cargadas con cobre expuestas a tres tiempos distintos (24 – 48 – 96 hrs). Para este caso, los tratamientos correspondieron a ácido láctico (0,04mM), ácido poli-láctico (0,04mM), Nano-Cu (0,04mM) y Cu (1,2mM). Luego de transcurridas las horas de los tratamientos según correspondiera, se procedió a realizar el mismo protocolo descrito anteriormente para analizar las muestras por citometría de flujo.

3.4. Análisis de Ciclo Celular por PI

Ambas líneas celulares, HuVEC y MKN, fueron cultivadas en placas de 60mm para evaluar el ciclo celular en dos tiempos distintos (24 - 48 hrs) y bajo 5 tratamientos diferentes (Ac. Láctico 0,04mM, PLA 0,04mM, Nano-PLA 0,04mM, Nano-Cu 0,04mM y CuSO₄ 1,2mM).

Luego de pasadas las horas destinadas al tratamiento según correspondiera, se procedió a evaluar el ciclo celular según el protocolo presentado a continuación.

- Tripsinizar células por 20 minutos. Colectar suspensión celular correspondiente a 1×10^6 células.
- Centrifugar muestras 3 min a 5000rpm. Eliminar el sobrenadante y resuspender células en 250uL de Buffer fosfato salino (PBS) a temperatura ambiente por 10 minutos.
- Agregar 750uL de etanol absoluto a -20°C . 15 minutos.
- Centrifugar muestras 3 min a 5000 rpm, eliminar sobrenadante y agregar 500uL de PBS a temperatura ambiente por 15 min para permitir la re-hidratación de las células.
- Agregar 1uL (RNasa A 10mg/mL).
- Agregar 1uL Triton X-100.
- Incubar a 37°C por 30 min.
- Centrifugar 5 min a 1.500 rpm y agregar 500uL de PBS.
- Agregar 1uL de Ioduro de Propidio (1:500), y cubrir con papel aluminio.
- Incubar a 4°C toda la noche.
- Analizar por citometría de flujo en presencia del colorante.

3.5. Ensayo de MTT

Este procedimiento, se basa en la reducción metabólica del Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) realizada por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa en un compuesto coloreado de color azul (Formazán), permitiendo determinar la funcionalidad mitocondrial de las células tratadas. Además, este método ha sido muy utilizado para medir citotoxicidad y proliferación celular. La cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de Formazán producido. Este método fue desarrollado por Mosmann en 1983 siendo modificado en el año 1986 por Francois Denizot y Rita Lang.

Se utilizaron placas de 96 pocillos (Orange Scientific) con células HuVEC y MKN (5000 células por pocillo), las cuales fueron expuestas por 24, 48 y 96 horas a 11 tratamientos distintos, con 8 repeticiones cada uno. Los tratamientos efectuados corresponden a, ácido láctico (0,04mM), PLA (0,04mM), Nano-PLA (0,04mM), Nano-Cu (0,04mM), Cu (1,2mM) y DMSO (1, 5, 10, 20, 50 y 100%) el cual se utilizó como control positivo.

Pasadas las horas correspondientes a cada tratamiento, se procedió a eliminar el medio y se agregaron 100uL de MTT (5mg/mL) a cada pocillo para posteriormente realizar una incubación por 3 horas a 37°C. Terminada la incubación, se eliminó la solución de MTT y se agregaron 100uL de DMSO por pocillo y se procedió a leer la placa en el equipo TECAN-HP a una absorbancia de 540nm en el Departamento de Ciencias Básicas de la Universidad de La Frontera.

Posteriormente se realizó el análisis estadístico de comparación de medias para determinar la existencia de diferencias significativas en los distintos tratamientos.

3.6. Análisis Estadístico

Para el análisis estadístico, se efectuó un análisis descriptivo, mientras que para el caso del tratamiento con MTT, se realizó un análisis mediante comparación de medias utilizando el programa “Statistica” empleando un valor $p \leq 0,05$.

IV. PRESENTACION DE RESULTADOS Y DISCUSION

4.1 Síntesis y caracterización de Nanopartículas

Siguiendo el protocolo descrito anteriormente, se sintetizaron nanopartículas de PLA (Fig. 5A) y de PLA cargadas con cobre (Fig. 5B). Además se realizó una caracterización por tamaño de ambas muestras, logrando observar que las nanopartículas cargadas con cobre mostraban un tamaño ligeramente mayor a las que no contenían el principio activo (Fig. 6).

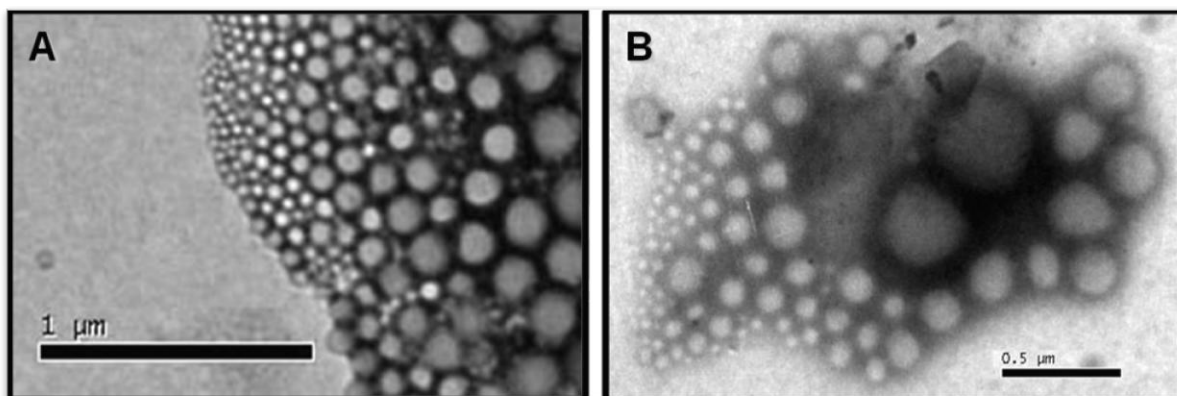


Figura 5: Se los datos obtenidos a partir de la síntesis de nanopartículas. 5A) Nanopartículas PLA, 5B) Nanopartículas Cu).

En la Figura 5 (A y B), podemos observar la imagen obtenida por microscopía electrónica de transmisión de las muestras de nanopartículas sintetizadas. Se puede ver que ambas muestras correspondientes a nanopartículas de PLA y nanopartículas PLA cargadas con cobre, muestran la presencia de partículas en escala nanométrica.

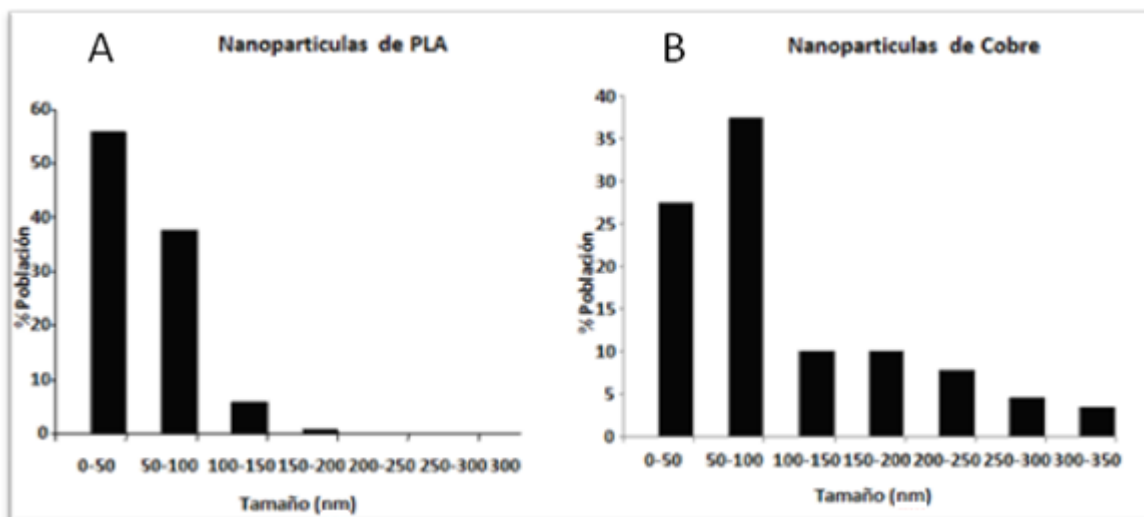


Figura 6: Se los tamaños en manómetros (nm) de la síntesis de nanopartículas. 6A) Nanopartículas PLA, 6B) Nanopartículas Cu)

A partir del análisis de la Figura 6, podemos observar que las nanopartículas cargadas con cobre poseen un mayor tamaño promedio que las nanopartículas de PLA. En el caso de las Nano-Cu, el mayor porcentaje de la población está entre los 50-100nm, mientras que en las Nano-PLA, está entre 0-50nm. Además se puede ver que en las Nano-Cu hay un mayor rango de tamaños, llegando hasta los 300-350nm.

4.2 Evaluación de citotoxicidad por cobre

4.2.1 HuVEC

En el Anexo 1 es posible observar los dot-plots correspondientes a cada uno de los tratamientos con cobre, mientras que en el Anexo 2 se observan las proporciones de apoptosis/necrosis para cada uno de los tratamientos realizados. En la figura 7, se observan los datos obtenidos para cada uno de los tratamientos con cobre en células HuVEC.

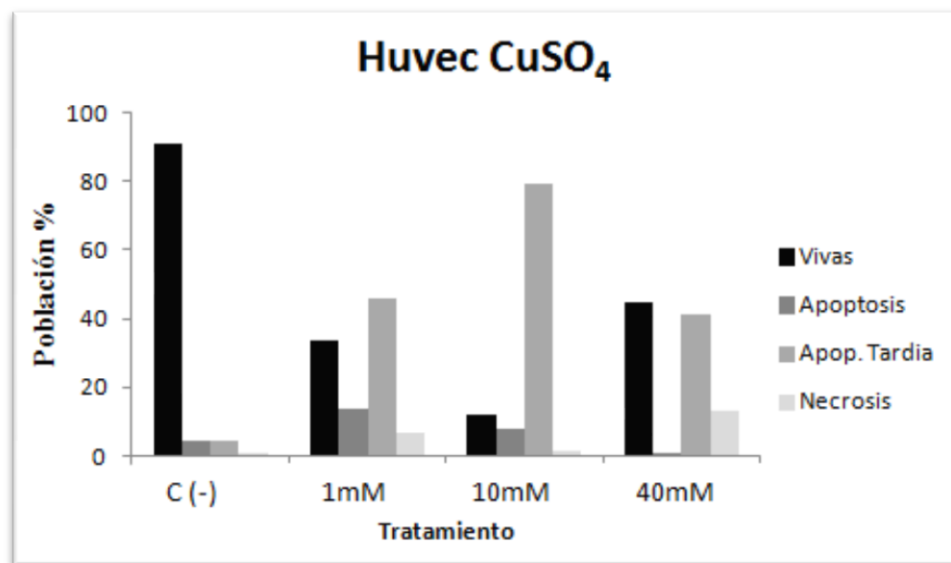


Figura 7: Se pueden observar las proporciones entre células vivas, apoptosis, apoptosis tardía y necrosis para cada uno de los tratamientos con cobre en células HuVEC.

Es posible observar un aumento en la apoptosis tardía en los tratamientos de 1mM y 10mM, sin embargo esta disminuye en el tratamiento con mayor concentración, lo cual puede ser debido a la excesiva concentración de cobre, lo cual produce auto-degradación de los transportadores CTR como postula Petris *et al.*, (2003). Por su parte, la viabilidad celular disminuye considerablemente, manteniendo una relación inversamente proporcional a la apoptosis tardía en las concentraciones de 1mM y 10mM.

4.2.2 MKN

En el Anexo 3 se observan los dot-plots correspondientes a cada uno de los tratamientos con cobre, mientras que en el Anexo 4 se observan las proporciones de apoptosis/necrosis para cada uno de los tratamientos realizados. En la figura 8, se observan los datos obtenidos para cada uno de los tratamientos con cobre en células MKN.

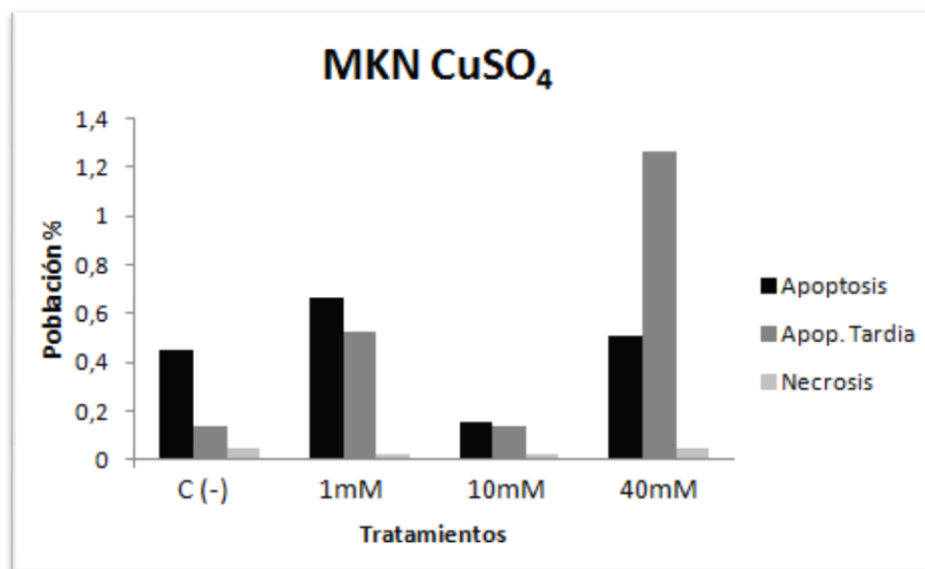


Figura 8: Se pueden observar las proporciones entre células apoptóticas, apoptosis tardía y necrosis para cada uno de los tratamientos con cobre en células MKN.

Es posible observar un paulatino aumento en la apoptosis tardía al aumentar la concentración de cobre, mientras que las células necróticas se mantienen prácticamente ausentes, alcanzando un máximo de un 0,05% en el tratamiento de 40mM. Por su parte, las células vivas (no mostradas), alcanzan entre un 98 y 99%, demostrando que el cobre no afecta la viabilidad celular al menos en las células cancerígenas.

4.3 Evaluación de citotoxicidad por Ac. Láctico.

4.3.1 HuVEC

En el Anexo 5 se observan los dot-plots correspondientes a cada uno de los tratamientos con ácido láctico, mientras que en el Anexo 6 se observan las proporciones de apoptosis/necrosis para cada uno de ellos. En la figura 9, observamos los datos obtenidos para cada uno de los tratamientos con ácido láctico en células HuVEC.

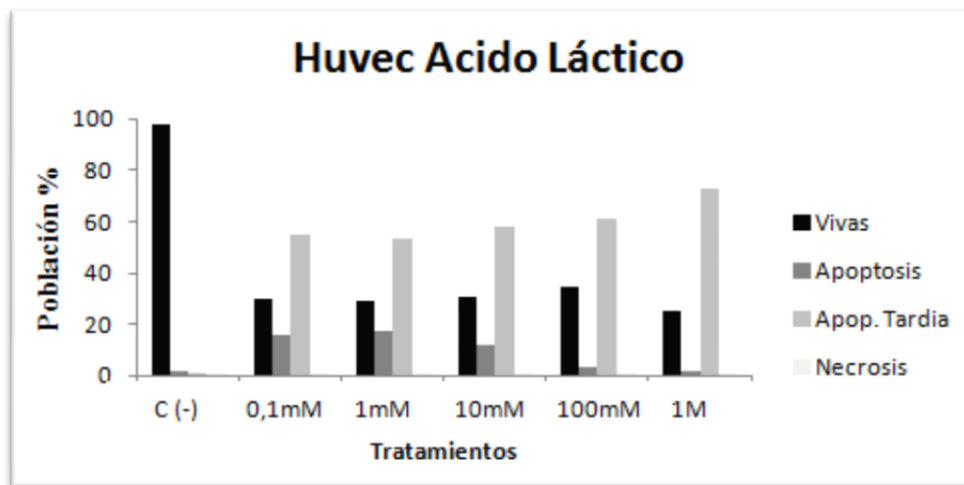


Figura 9: Se observa la distribución tanto de células vivas, apoptóticas, con apoptosis tardía y necróticas para cada uno de los tratamientos de ácido láctico en celular HuVEC.

Es posible observar una considerable disminución en la viabilidad celular a partir de la concentración más baja de ácido láctico. Así mismo, es posible observar un aumento leve pero sostenido en apoptosis tardía a medida que aumenta la concentración de ácido láctico; las células necróticas, se mantienen prácticamente ausentes alcanzando un valor máximo de 0,63% a 100mM. Esto indica que en células no cancerígenas, el ácido láctico induce la muerte celular mayoritariamente por el proceso apoptótico.

4.3.2 MKN

En el Anexo 7 se observan los dot-plots correspondientes a cada uno de los tratamientos con ácido láctico, mientras que en el Anexo 8 se observan las proporciones de apoptosis/necrosis para cada uno de ellos. En la figura 10, observamos los datos obtenidos para cada uno de los tratamientos con ácido láctico en células MKN.

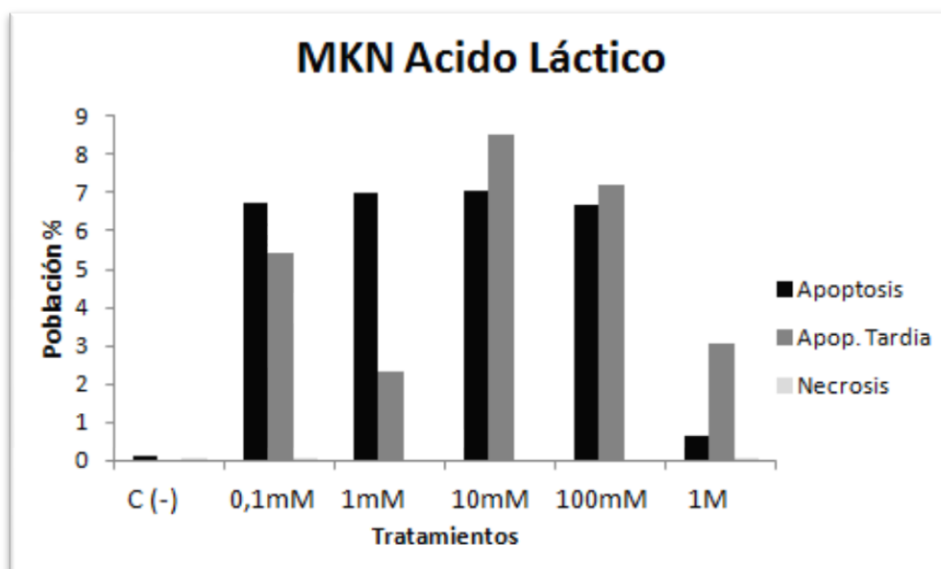


Figura 10: Se observan las proporciones de células apoptóticas, apoptosis tardía y necrosis para cada uno de los tratamientos con ácido láctico en células MKN.

Podemos observar que las células bajo los tratamientos con ácido láctico mantienen una alta viabilidad (sobre el 84%) en cada una de las concentraciones suministradas. Esto hace suponer que, por si solo, el ácido láctico no tiene efectos citotóxicos considerables en este tipo celular, o como postuló Martínez-Outschoorn *et al.*, (2011), puede tener incluso un efecto proliferativo en tiempos mas largos. En este caso, podemos decir que los tratamientos con ácido láctico presentan una mayor citotoxicidad en las células normales HuVEC que en las células cancerígenas MKN.

4.4 Evaluación de citotoxicidad por nanopartículas con cobre.

4.4.1 HuVEC

En los Anexos 9, 10 y 11 se observan las tablas de datos con las proporciones de apoptosis/necrosis para cada uno de los tratamientos. En las figuras 11, 12 y 13, observamos los datos obtenidos para cada uno de los tratamientos de 24, 48 y 96 horas en células HuVEC.

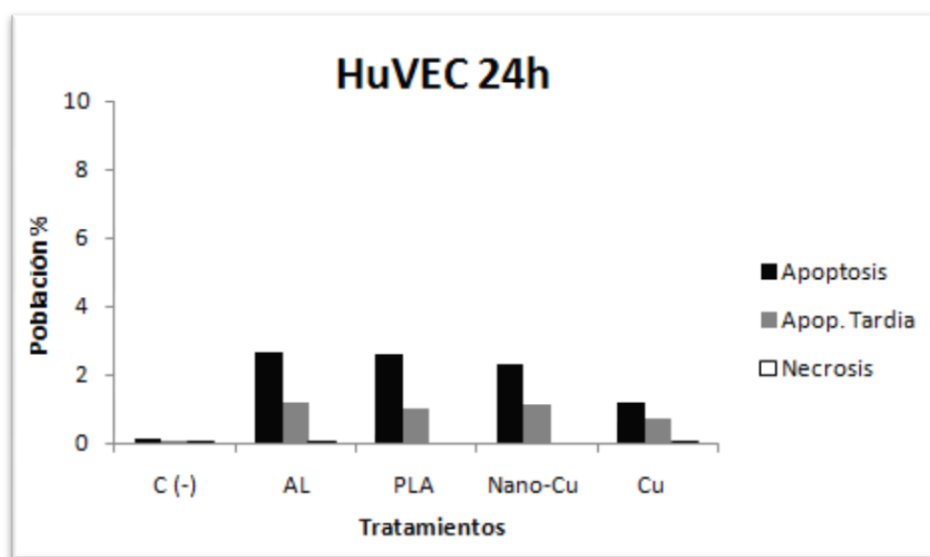


Figura 11: Se observan las proporciones de células apoptóticas, apoptosis tardía y necrosis para cada uno de los tratamientos de 24 horas en células HuVEC.

Para el tratamiento de 24 horas, es posible observar que no existe mayor efecto sobre la viabilidad celular, ya que la citotoxicidad alcanza a un máximo del 3,87% en las células tratadas con ácido láctico provocando principalmente el proceso apoptótico. En el caso del tratamiento con nanopartículas cargadas con cobre se observa una citotoxicidad menor, llegando solo al 3,48%.

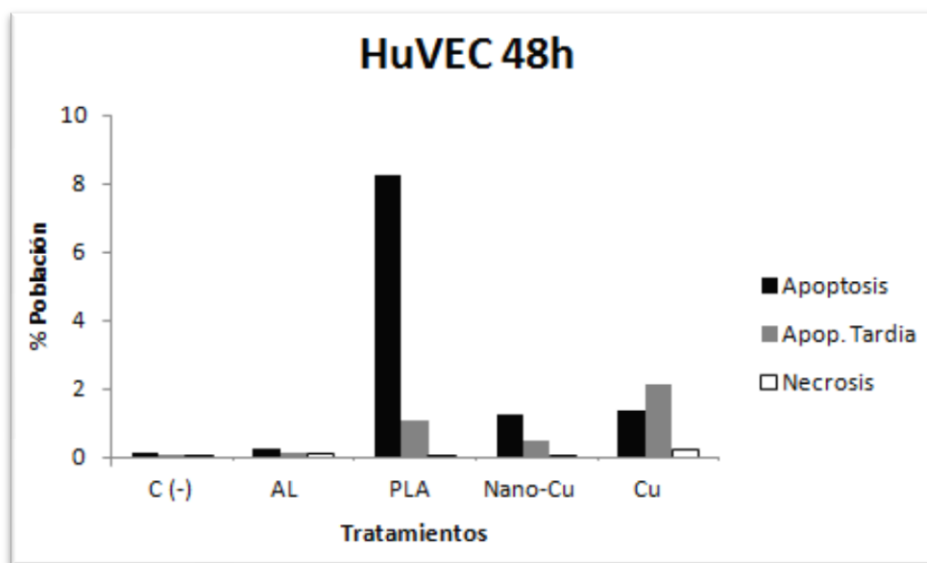


Figura 12: Se observan las proporciones de células apoptóticas, apoptosis tardía y necrosis para cada uno de los tratamientos de 48 horas en células HuVEC.

En el tratamiento de 48 horas, se observa un aumento en la citotoxicidad por PLA en comparación con el tratamiento de 24 horas, sin embargo, en las demás muestras la viabilidad se mantiene sobre el 90%.

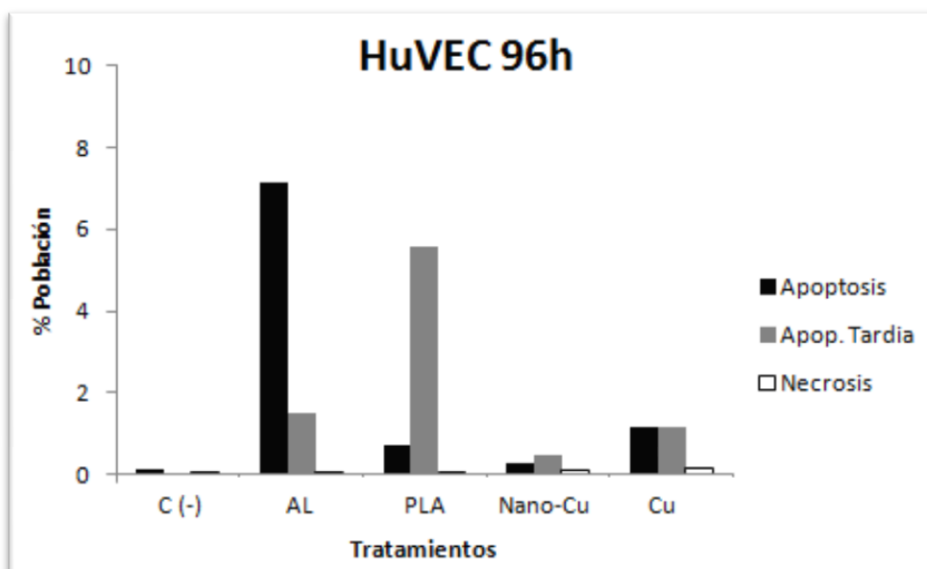


Figura 13: Se observan las proporciones de células apoptóticas, apoptosis tardía y necrosis para cada uno de los tratamientos de 96 horas en células HuVEC.

Para el tratamiento de 96 horas, es posible observar un aumento en la citotoxicidad por ácido láctico alcanzando un 7,14% de células apoptóticas, mientras que en el caso del tratamiento con PLA observamos una relación entre la apoptosis vista en el tratamiento de 48 horas y la apoptosis tardía vista en este caso a las 96 horas. El tratamiento con Nano-Cu, sigue manteniéndose en rangos porcentuales menores respecto a los demás, llegando solo al 0,87%.

La alta viabilidad celular observada en los tratamientos con cobre y Nano-Cu, muestran que estos no afectan la viabilidad de las células normales HuVEC. Además, observamos que el PLA comienza a provocar apoptosis celular a partir de las 48 horas, la cual se transforma en apoptosis tardía a las 96 horas. En el caso del ácido láctico, comienza a mostrar actividad citotóxica a las 96 horas, desencadenando principalmente el proceso apoptótico.

4.4.2 MKN

En los Anexos 12, 13 y 14 observan las tablas de datos con las proporciones de apoptosis/necrosis para cada uno de los tratamientos. En las figuras 14, 15 y 16, observamos los datos obtenidos para cada uno de los tratamientos de 24, 48 y 96 horas en células MKN.

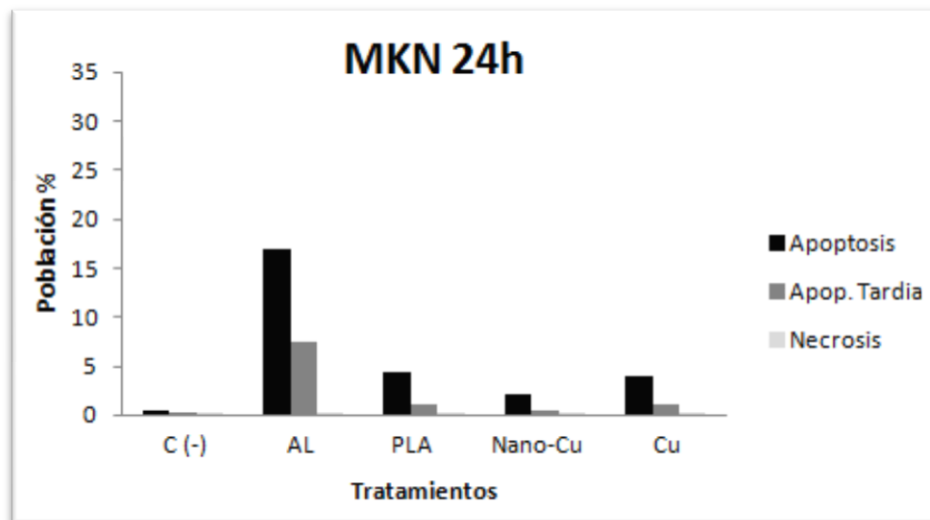


Figura 14: Se observan las proporciones de células apoptóticas, apoptosis tardía y necrosis para cada uno de los tratamientos de 24 horas en células MKN.

En el tratamiento de 24 horas, el ácido láctico muestra actividad citotóxica cercana al 25%, donde la mayor parte corresponde a células apoptóticas, por otro lado, la viabilidad celular de los otros tratamientos se mantiene sobre un 94%.

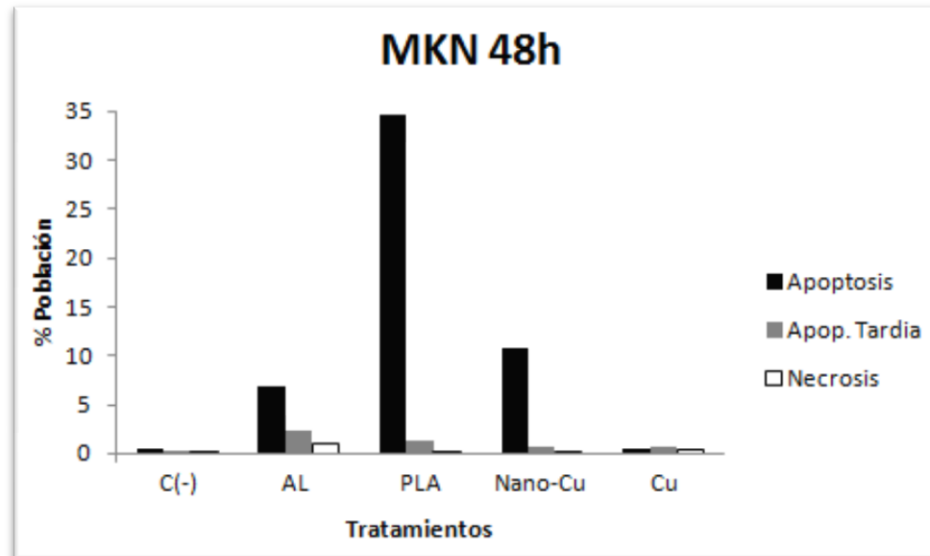


Figura 15: Se observan las proporciones de células apoptóticas, apoptosis tardía y necrosis para cada uno de los tratamientos de 48 horas en células MKN.

Para el tratamiento de 48 horas, es posible observar una marcada citotoxicidad por PLA, alcanzando sobre el 35%, donde la mayor parte de las células se encuentran en apoptosis. Además, se observa una disminución de la viabilidad celular en el tratamiento Nano-Cu (88,5%), mientras que el tratamiento con cobre la citotoxicidad alcanza solo un 1,5%.

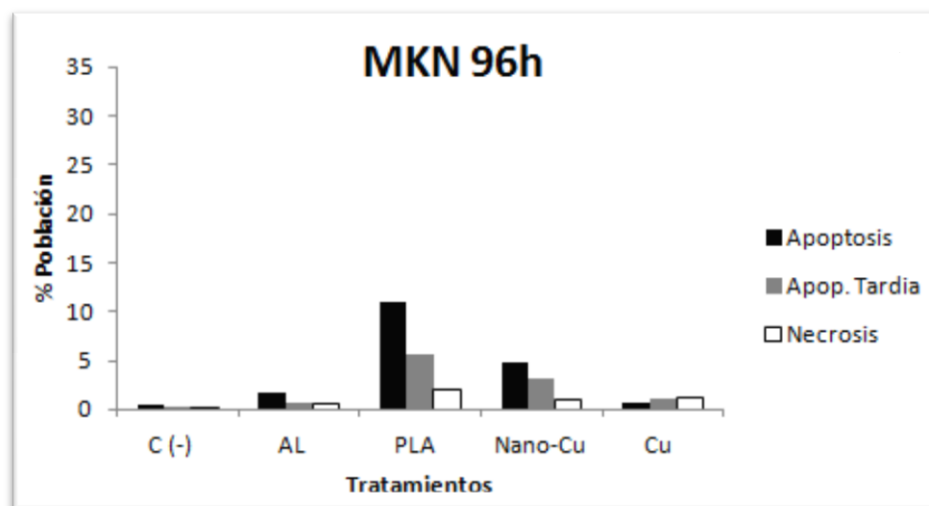


Figura 16: Se observan las proporciones de células apoptóticas, apoptosis tardía y necrosis para cada uno de los tratamientos de 96 horas en células MKN.

En el tratamiento de 96 horas, el PLA, muestra una citotoxicidad de un 18,6%, valor menor al encontrado en el tratamiento de 48 horas, mientras que la viabilidad celular observada en el tratamiento Nano-Cu es similar a la obtenida en el tratamiento de 48 horas. En el caso del cobre, la citotoxicidad observada alcanza el 2,9%.

En los tres ensayos descritos anteriormente, es posible observar una alta citotoxicidad por AL (24 hrs) y PLA (48 hrs), la cual comienza a disminuir en los ensayos siguientes. Esto podría indicar que inicialmente estos compuestos resultan ser citotóxicos para la célula, mientras que en tratamientos más largos resultan ser inocuos. Además, podemos indicar que la concentración de cobre utilizada (0,04mM), no genera una disminución importante en la viabilidad celular de las células cancerígenas, mientras que el tratamiento con Nano-Cu, provoca un efecto citotóxico mayor en células cancerígenas que en células HuVEC.

4.5. Análisis de Ciclo Celular

4.5.1 HuVEC

A partir de los tratamientos realizados, se obtuvieron datos correspondientes a las fases del ciclo celular a las 24 y 48 horas (Anexos 15-18). En las figuras mostradas a continuación, se observan los gráficos de poblaciones celulares para las fases G1 (Fig. 17), S (Fig. 18) y G2 (Fig. 19) en células HuVEC.

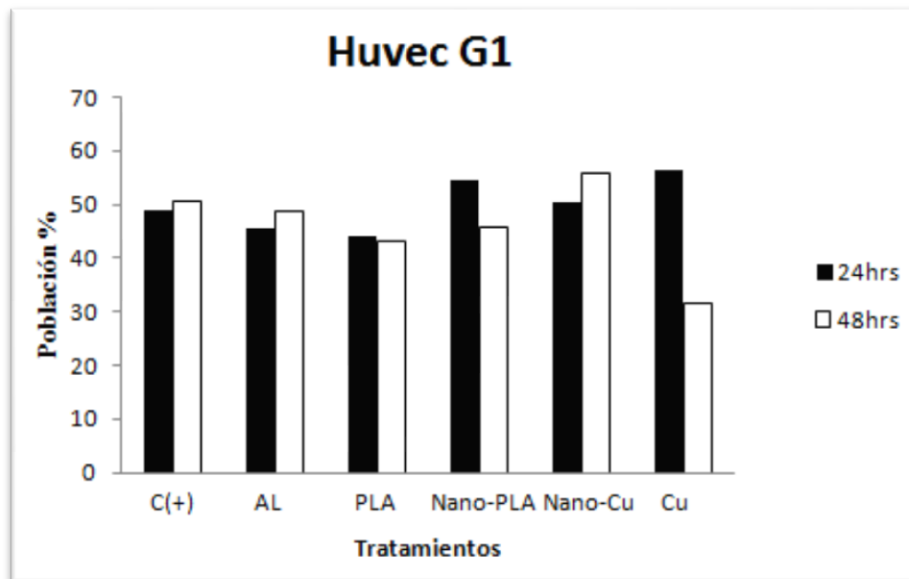


Figura 17: Se observa la fase G1 del ciclo celular para cada uno de los tratamientos en células HuVEC.

En el caso de la fase G1, podemos observar que a las 24 horas, el control y los tratamientos se mantienen en un rango cercano al 50%, mientras que en el caso de los tratamientos de 48 horas, es posible observar un marcado descenso (19,08%) en el tratamiento Cu al compararlo con su respectivo control.

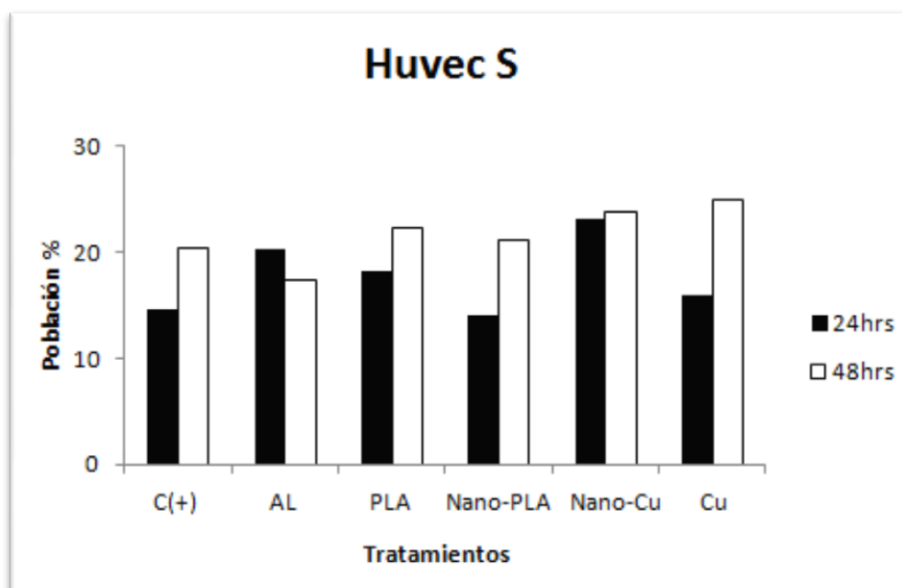


Figura 18: Se observa la fase S del ciclo celular para cada uno de los tratamientos en células HuVEC.

En la fase S del ciclo celular, se puede observar que a las 24 horas se provoca un leve aumento en los tratamientos con AL y Nano-Cu comparados con el respectivo control, mientras que a las 48 horas, no se observan diferencias porcentuales importantes entre el control y los tratamientos.

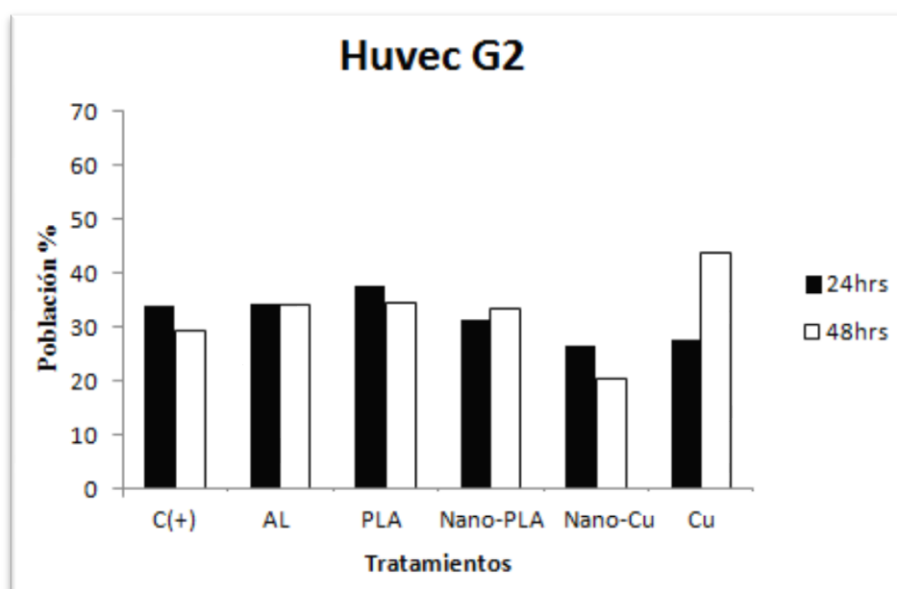


Figura 19: Se observa la fase G2 del ciclo celular para cada uno de los tratamientos en células HuVEC.

En la fase G2, es posible observar que los tratamientos de 24 y 48 horas con ácido láctico, PLA y Nano-PLA se mantienen en un rango cercano al 30%. Sin embargo, observamos un descenso de un 8,91% bajo el tratamiento Nano-Cu 48hrs comparado con el control respectivo; mientras que el tratamiento de Cu 48hrs muestra un aumento de un 14,5%.

4.5.2 MKN

A partir de los tratamientos realizados, se obtuvieron los datos correspondientes a las fases del ciclo celular a las 24 y 48 horas (Anexos 19–22). En las figuras, se observan los gráficos con los datos de las fases G1 (Fig. 20), S (Fig. 21) y G2 (Fig. 22) en células MKN.

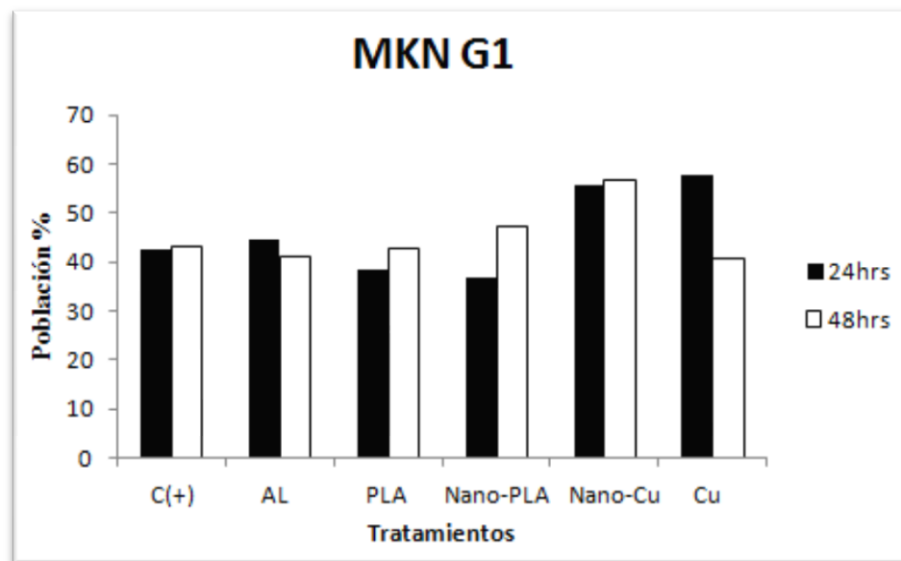


Figura 20: Se observa la fase G1 del ciclo celular para cada uno de los tratamientos en células MKN.

Podemos observar que los tratamientos de ácido láctico, PLA y Nano-PLA se mantienen, al igual que sus respectivos controles, en un rango cercano al 40%. Sin embargo, el tratamiento de Nano-Cu, produjo un aumento de G1 en 13,46% y 13,43% a las 24 y 48 hrs respectivamente al compararlo con los controles. Mientras que el tratamiento con Cu 24hrs, mostró un aumento en G1 de un 15,36%.

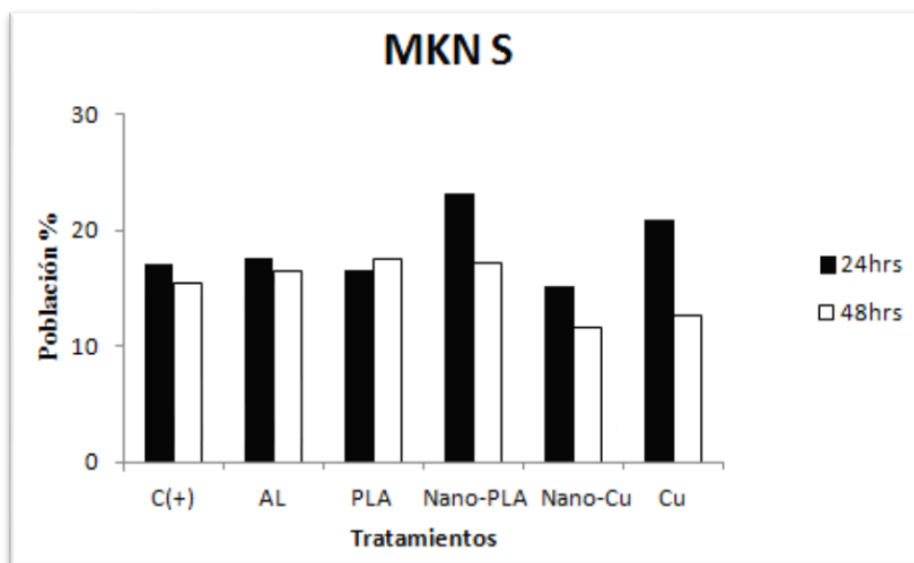


Figura 21: Se observa la fase S del ciclo celular para cada uno de los tratamientos en células MKN.

En la fase S, a las 24 horas podemos observar que los tratamientos con AL, PLA y Nano-Cu se mantienen, al igual que sus respectivos controles, en un rango cercano al 17%, en cambio los tratamientos de Nano-PLA y Cu, presentan un leve aumento. En el caso de los tratamientos de 48 horas, el tratamiento correspondiente a Nano-Cu, muestra un ligero descenso de 3,79%.

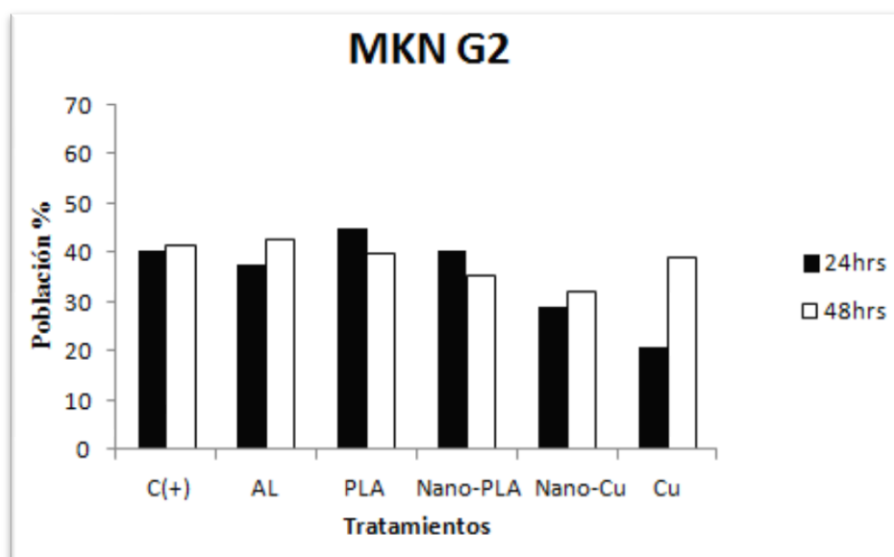


Figura 22: Se observa la fase G2 del ciclo celular para cada uno de los tratamientos en células MKN.

Para la fase G2, es posible determinar que los tratamientos de ácido láctico, PLA y Nano-PLA se mantienen en un rango cercano al 40%, mientras que el tratamiento Nano-Cu, muestra un descenso de un 11,52% y 9,64% 24 y 48 horas respectivamente al compararlo con el control. En el caso del tratamiento Cu, éste muestra un marcado descenso en la fase G2 de 19,52% a las 24 horas, mientras que las 48 horas, se mantiene similar a su respectivo control.

Finalmente podemos decir que en el caso del tratamiento de Nano-Cu, se observa una disminución en la fase S y G2; esto indica que el tratamiento está disminuyendo la proliferación celular en las células cancerígenas, llevándolas al estado G1.

4.6 Evaluación de citotoxicidad por MTT

4.6.1 HuVEC

Se obtuvieron los datos de citotoxicidad para células HuVEC mediante MTT para cada tratamiento a la cual las células fueron expuestas (Fig. 23). En el Anexo 23, se pueden observar las tablas de datos correspondientes a los tratamientos de 24, 48 y 96 horas respectivamente.

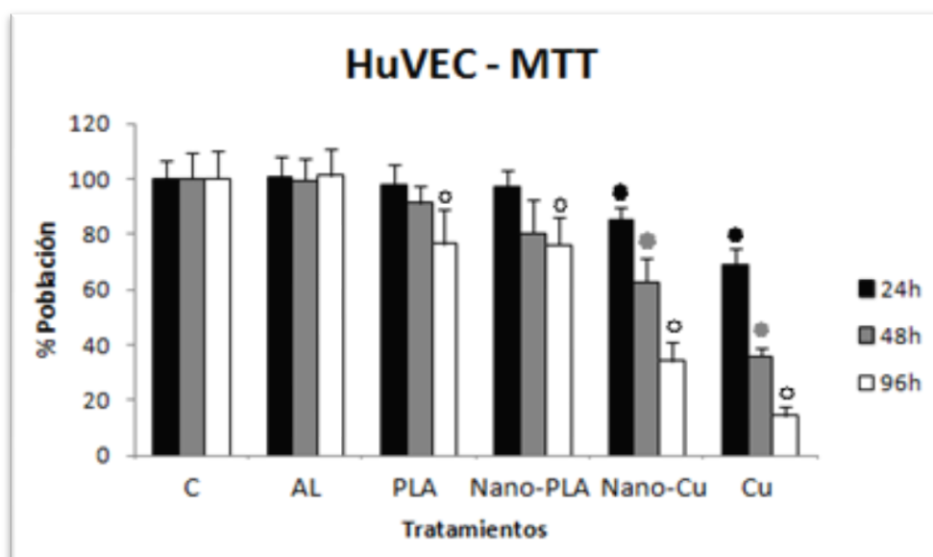


Figura 23: Se observa el gráfico correspondiente al porcentaje de viabilidad celular obtenida para cada uno de los tratamientos luego de la incubación con MTT en células HuVEC.

A partir de los valores p mostrados en el anexo 23, podemos decir que en los tratamientos correspondientes a las 24 y 48 horas, se encontraron diferencias significativas en Nano-Cu y Cu, mientras que en el caso de los tratamientos de 96 horas, se observaron diferencias estadísticamente significativas en PLA, Nano-PLA, Nano-Cu y Cu.

Los tratamientos que mostraron mayor citotoxicidad correspondieron a Nano-Cu y Cu 96 horas, donde la viabilidad celular correspondió a un 34,4% y 14,7% respectivamente.

4.6.2 MKN

Se obtuvieron los datos de citotoxicidad para células MKN mediante MTT para cada tratamiento a la cual las células fueron expuestas (Fig. 24). En el Anexo 24, se pueden observar las tablas de datos correspondientes a los tratamientos de 24, 48 y 96 horas respectivamente.

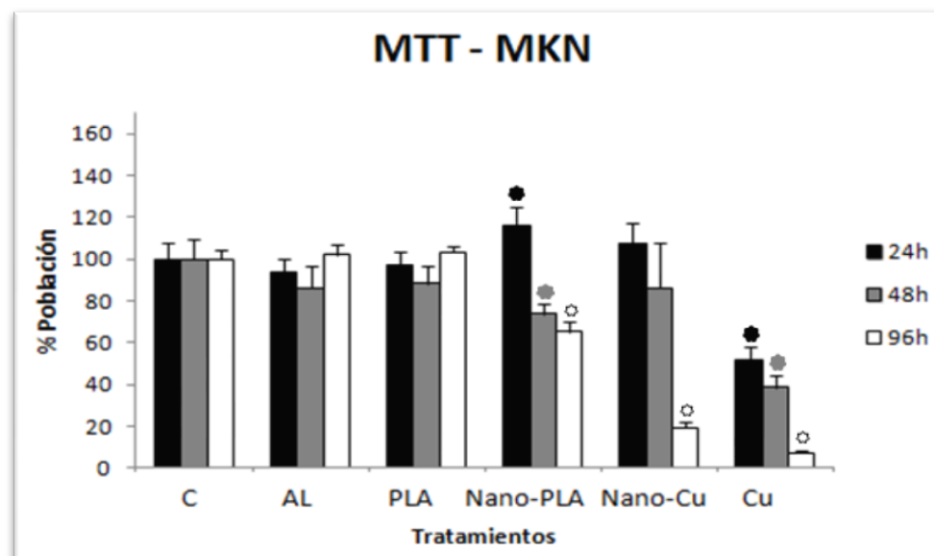


Figura 24: Se observa el gráfico correspondiente al porcentaje de viabilidad celular obtenida para cada uno de los tratamientos luego de la incubación con MTT en células MKN.

A partir de los valores p mostrados en el anexo 24, se indica que en los tratamientos correspondientes a las 24 y 48 horas, se encontraron diferencias significativas en Nano-PLA y Cu. En el caso de los tratamientos de 96 horas, se observaron diferencias estadísticamente significativas en Nano-PLA, Nano-Cu y Cu.

Los tratamientos que mostraron mayor citotoxicidad corresponden a Nano-Cu y Cu 96 horas, donde la viabilidad celular correspondió a un 19,2% y 7,2% respectivamente. Estos resultados indican que los tratamientos resultan en una citotoxicidad mayor en células cancerígenas que en las células normales HuVEC.

V. CONCLUSIONES

Se logró sintetizar nanopartículas de PLA y nanopartículas de PLA cargadas con cobre para analizar su comportamiento en células cancerígenas MKN y no cancerígenas HuVEC. El tamaño de las nanopartículas sintetizadas tuvo valores entre los 0 - 350nm, teniendo un tamaño mayor las que fueron cargadas con el agente activo metálico. El mayor porcentaje de las nanopartículas sintetizadas fue menor a 150nm, tamaño ideal según Schadlich *et al.*, (2011), ya que las nanopartículas de mayor tamaño serían más propensas a ser eliminadas por el hígado.

Los análisis de YOPRO-1/IP con cobre, mostraron que las células HuVEC sufrieron un mayor efecto citotóxico que las células MKN. Se pudo observar que la mayor citotoxicidad se logró en las células HuVEC a la concentración de 10mM, mientras que ésta disminuyó al ser expuesta a la concentración de 40mM de cobre; esto se puede explicar por la auto-degradación de los transportadores de cobre (CTR) la cual ocurre cuando las células están expuestas a altas concentraciones del metal, tal como lo indica Petris *et al.*, (2003).

Para el caso del análisis de YOPRO-1/IP con ácido láctico, se observó que las células HuVEC sufrieron un mayor efecto citotóxico que las células cancerígenas, donde incluso la exposición a la concentración más baja de ácido láctico (0,1mM) mostró una marcada disminución en la viabilidad, induciéndolas al igual que en el análisis con cobre, principalmente al proceso de apoptosis. En cambio, las células cancerígenas no se vieron mayormente afectadas incluso a la concentración más alta (1M). Esto corrobora lo indicado por Martínez *et al.*, (2011), respecto a que el ácido láctico no tiene efectos citotóxicos sobre las células cancerígenas, y que incluso pueden aumentar su proliferación.

El análisis de citotoxicidad YOPRO-1/IP por nanopartículas cargadas con cobre, indicó que las células cancerígenas presentan una mayor citotoxicidad que las células normales HuVEC, ya que los datos obtenidos muestran que la mayor citotoxicidad encontrada en las células no

cancerígenas alcanza un 3,48% a las 24 horas, mientras que en las células MKN, alcanzan un 11,42% a las 48 horas.

En el caso del ciclo celular, las células HuVEC mostraron una disminución de la fase G1 con el tratamiento Cu 48 hrs. Mientras que en las células MKN, se mostró un aumento en G1 con los tratamientos con cobre y Nano-Cu, lo cual comprueba que ambos tratamientos provocan una disminución en la proliferación celular debido al aumento en la fase G1 del ciclo celular en células cancerígenas.

Para el análisis citotoxicidad por MTT en células HuVEC, se observaron efectos citotóxicos principalmente en los tratamientos Nano-Cu y Cu, mientras que en las células MKN se observaron efectos anti-proliferativos los mismos tratamientos de Nano-Cu y Cu a las 96 horas, sin embargo, el efecto citotóxico observado, indica que las células MKN muestran mayor citotoxicidad que las células normales.

A partir de los resultados obtenidos, podemos indicar que la hipótesis expuesta en esta investigación es aceptada, debido a que la proliferación celular en las células cancerígenas se ve disminuida al aplicar los tratamientos con Nano-Cu.

VI. RESUMEN

El ácido poli-láctico, es un polímero utilizado en aplicaciones biomédicas debido a su capacidad de bio-absorción y a su alta tasa de biodegradabilidad. La liberación controlada de drogas mediante nanopartículas se mantiene como las formas más convenientes de suministrar drogas. Debido a eso, se utilizó la técnica de doble emulsión (w/o/w) para sintetizar Nanopartículas de PLA (Nano-PLA) y cobre (Nano-Cu). El cobre, tiene una reconocida actividad germicida y juega un rol importante en el tratamiento del cáncer. Sin embargo, el ácido láctico, compuesto esencial de las nanopartículas, parece tener un efecto proliferativo en el cáncer. En esta investigación, se describen los efectos citotóxicos de Nano-PLA y Nano-Cu en una línea celular de cáncer gástrico MKN y en una línea endotelial no cancerígena HuVEC. Esta comparación, permitirá determinar cómo afectan los tratamientos a ambas líneas celulares.

Los experimentos, consisten en test de viabilidad bajo concentraciones crecientes de cobre y ácido láctico; Nano-PLA y Nano-Cu. El test de apoptosis/Necrosis fue realizado por el kit VIBRANT (Invitrogen). Además, se muestran análisis de ciclo celular usando citometría de flujo. Se expusieron ambas líneas celulares a tratamientos con Nano-PLA, Nano-Cu, ácido láctico y CuSO_4 , mostrando importantes diferencias versus el tratamiento. Los resultados obtenidos, indican que el ácido láctico muestra citotoxicidad en células HuVEC.

Los análisis de ciclo celular muestran que en las células HuVEC el estado S aumenta con CuSO_4 y el estado G2 aumenta con Nano-Cu. En células MKN, el estado G1 aumenta con Nano-Cu y Cu.

Además se realizó un análisis por MTT el cual no mostró efectos citotóxicos sobre las células MKN tratadas con ácido láctico, PLA, Nano-PLA y DMSO 1%. Estos resultados confirman el rol del cobre en el tratamiento del cáncer y el efecto tóxico del ácido láctico en las células normales.

VII. SUMMARY

Poly-lactic acid (PLA), is a bio-absorbable polymer useful in biomedical applications, non-toxic, and with good biodegradability rate. The controlled release of drugs remains the most convenient way of drug delivery by encapsulation techniques using nanoparticles. We use the double emulsion technique (w/o/w) for synthesize PLA (Nano-PLA) and copper nanoparticles Nano-Cu. Copper have a recognized germicidal activity and a role in cancer treatment. However, lactic acid an elemental compound of Nano-PLA appears to have a cancer proliferative effect. In this investigation, we describe the cytotoxic effects of Nano-PLA and Nano-Cu in gastric cancer cells MKN and in non-cancer endothelial cells HuVEC. This comparison allows to determine how treatments affect both normal and cancer cells line.

The experiments consisted in viability tests under different treatments as growing concentrations of copper and lactic acid; Nano-PLA and Nano-Cu. The Apoptosis/Necrosis test was performed with the VIBRANT kit (Invitrogen). In addition, we show cell cycle analysis, using flow cytometry. We expose the cancer and non-cancer cells to treatments with Nano-PLA, Nano-Cu, lactic acid and CuSO_4 , proving that both cells lines shows important differences versus treatments. The results obtained indicate that acid show a cytotoxic effects in HuVEC cells.

In the cell cycle analysis we show that in HuVEC, the S state is increase by CuSO_4 and G2 is also increase by Nano-Cu. In MKN cells, the G1 is increase by Nano-Cu and Cu.

Also a MTT assay was performed, showing no cytotoxic effects in MKNcells by lactic acid, PLA, Nano-PLA and DMSO 1%. These results confirm the role of copper in cancer treatment, and lactic acid as a toxic compound to normal cells.

VIII. LITERATURA CITADA

1. **Avgoustakis, K. et al.** 2002. PLGA–mPEG nanoparticles of cisplatin: in vitro nanoparticle degradation, in vitro drug release and in vivo drug residence in blood properties, *Journal of Controlled Release*. 79 123–135.
2. **Bertino J y L'Abbé MR.** 2004. Maintaining copper homeostasis: regulation of copper-trafficking proteins in response to copper deficiency or overload. *J Nutr Biochem*. 15: 316-322.
3. **Blair, B. G., C. A. Larson, et al.** 2009. Copper transporter 2 regulates the cellular accumulation and cytotoxicity of Cisplatin and Carboplatin. *Clin Cancer Res*. 15 (13): 4312-4321.
4. **Brewer, G. J., R. D. Dick, et al.** 2000. Treatment of metastatic cancer with tetrathiomolybdate, an anticopper, antiangiogenic agent: Phase I study. *Clin Cancer Res*. 6 (1): 1-10.
5. **Caruano-Yzermans AL, Bartnikas TB y Gitlin JD.** 2006. Mechanisms of the copper dependent turnover of the copper chaperone for superoxide dismutase. *J Biol Chem*. 281: 13581-13587.
6. **Cirstoiu-Hapca A, Bossy-Nobs L, Buchegger F, Gurny R, Delie F.** 2007. Differential tumor cell targeting of anti-HER2 (Herceptin[®]) and anti-CD20 (Mabthera[®]) coupled nanoparticles. *Int J Pharm*. 331: 190-196.
7. **Csendes A, Smok G, Medina E, Salgado I, Rivera R, Quitral M.** 1992. Clinical course characteristics of gastric cancer, 1958-1990. *Rev. Med Chi*. Jan; 120 (1): 36-42.
8. **Cui, F.D., Tao, A.J., Cun, D.M., Zhang, L.Q. & Shi, K.** 2007. Preparation of insulin loaded PLGA-Hp55 nanoparticles for oral delivery. *J. Pharm. Sci*. 96: 421-7.
9. **Denizot F., Lang R.** 1986. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival, Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J. Immunol. Methods*. 89: 271–277.

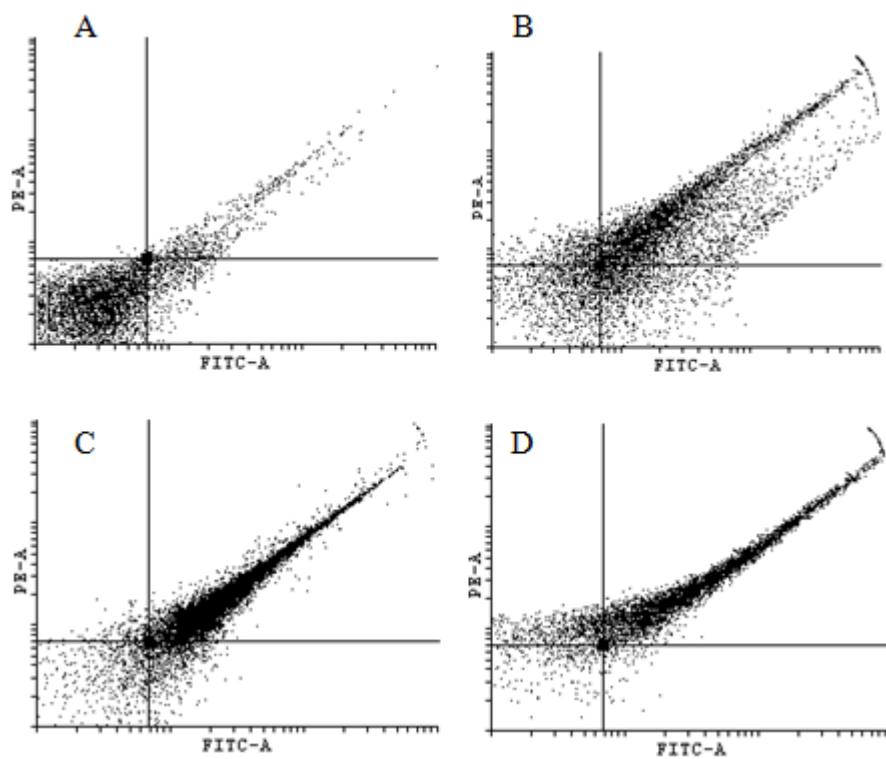
10. **Derakhshandeh, K., Erfan, M. & Dadashzadeh, S.** 2007. Encapsulation of 9-nitrocamptothecin, a novel anticancer drug, in biodegradable nanoparticles: factorial design, characterization and release kinetics. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 66: 34-41.
11. **Dey P.** 2004. Aneuploidy and malignancy: an unsolved equation. *J Clin Pathol*; 57: 1245-9.
12. **Ding, W. Q. and S. E. Lind.** 2009. Metal ionophores - an emerging class of anticancer drugs." *IUBMB Life.* 61 (11): 1013-1018.
13. **Duan, Yongxin; Noda, Isao; Ozaki, Yukihiro; Sato, Harumi; Tsuji, Hideto; Yan, Shouke; Zhang, Jianming.** 2005. Crystal Modifications and Thermal Behavior of Poly (L-lactic acid) Revealed by Infrared Spectroscopy. *Macromolecules.* 8012-8021.
14. **Espinoza, A., S. Le Blanc, et al,** 2011. Iron, Copper, and Zinc Transport: Inhibition of Divalent Metal Transporter 1 (DMT1) and Human Copper Transporter 1 (hCTR1) by shRNA. *Biol Trace Elem Res.*
15. **Furukawa, T., M. Komatsu, et al.** 2008. Copper transport systems are involved in multidrug resistance and drug transport. *Curr Med Chem.* 15 (30): 3268-3278.
16. **Harris ED.** 1997. Copper. En, *Handbook of Nutritionally Essential Mineral Elements.* O'Dell BL, Sunde R (Eds.). Marcel Dekker. New York. pp. 231-273
17. **Huang, R., A. Wallqvist, et al.** 2005. Anticancer metal compounds in NCI's tumor-screening database: putative mode of action. *Biochem Pharmacol.* 69 (7): 1009-1039.
18. **Jain, K. K.** 2005. Nanotechnology-based drug delivery for cancer, *Technol. Cancer Res. Treat.* 4, 407.
19. **Jain, RA.** 2000. The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly (lactide-co-glycolide) (PLGA) devices. *Biomaterials.* 21: 2475-2490.
20. **Kang, S.W., Lim, H.W., Seo, S.W., Jeon, O., Lee, M. & Kim, B.S.** 2008. Nanosphere-mediated delivery of vascular endothelial growth factor gene for therapeutic angiogenesis in mouse ischemic limbs. *Biomaterials.* 29: 1109-17.
21. **Kim, J. K., P. J. Kim, et al.** 2010. Decreased expression of annexin A10 in gastric cancer and its overexpression in tumor cell growth suppression. *Oncol Rep.* 24 (3): 607-612.

22. **Kumar, P.S., Saini, T.R., Chandrasekar, D., Yellepeddi, V.K., Ramakrishna, S. & Diwan, P.V.** 2007. Novel approach for delivery of insulin loaded poly (lactide-coglycolide) nanoparticles using a combination of stabilizers. *Drug Deliv.* 14: 517-23.
23. **Lecaroz, C., Gamazo, C. & Blanco-Prieto, M.J.** 2006. Nanocarriers with gentamicin to treat intracellular pathogens. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 6: 3296-302.
24. **Lee, H., Chung, H.J. & Park, T.G.** 2007. Perspectives on: local and sustained delivery of angiogenic growth factors. *J. Bioactive and Compatible Polymers.* 22: 89-114
25. **Lunt, James.** 1997. Large-scale production, properties and commercial applications of polylactic acid polymers. *Polymer Degradation and Stability.* Elsevier. 145-152.
26. **Lutsiak, M.E., Kwon, G.S. & Samuel, J.** 2006. Biodegradable nanoparticle delivery of a Th2-biased peptide for induction of Th1 immune responses. *J. Pharm. Pharmacol.* 58: 739-47
27. **Martinez-Outschoorn, U. E., M. Prisco, et al.** 2011. Ketones and lactate increase cancer cell "stemness," driving recurrence, metastasis and poor clinical outcome in breast cancer: achieving personalized medicine via Metabolo-Genomics. *Cell Cycle.* 10 (8): 1271-1286.
28. **Marzano C, Pellei M, Tisato F, Santini C.** 2009. Copper complexes as anticancer agents. *Anti-Cancer Agents. Med Chem.* 9:185–211.
29. **Mattheolabakis, G., Taoufik, E., Haralambous, S., Roberts, M.L. & Avgoustakis, K.** 2008. In vivo investigation of tolerance and antitumor activity of cisplatin-loaded PLGA-mPEG nanoparticles. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*
30. **Mo, Y. & Lim, L.Y.** 2005. Paclitaxel-loaded PLGA nanoparticles: potentiation of anticancer activity by surface conjugation with wheat germ agglutinin. *J. Control Release.* 108: 244-62.
31. **Mosmann T.** 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assay. *J. Immunol. Methods.* 65: 55–63.
32. **Muller PAJ y Klomp LWJ.** 2009. ATOX1: A novel copper – responsive transcription factor in mammals. *Int J Biochem Cell B.* 41: 1233-1236.
33. **Petris MJ, Smith K, Lee J y Thiele DJ.** 2003. Copper – stimulates endocytosis and degradation of the human copper transporter, hCtr1. *J Biol Chem.* 278: 9639-9646.

34. **Pinto Reis, C., Neufeld, R.J., Ribeiro, A.J. & Veiga, F.** 2006. Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. *Nanomedicine*. 2: 8-21.
35. **Schadlich, A., H. Caysa, et al.** 2011. Tumor accumulation of NIR fluorescent PEG-PLA nanoparticles: impact of particle size and human xenograft tumor model. *ACS Nano* 5 (11): 8710-8720.
36. **Singh, K. K.** 2005. Nanotechnology in cancer detection and treatment. *Technol. Cancer Res. Treat.* 4, 583.
37. **Stehelin D.** 1976. The transforming gene of avian tumor viruses. *Pathol Biol.* 24: 513-15.
38. **Takikawa, M., Y. Akiyama, et al.** 2006. Proteomic analysis of a highly metastatic gastric cancer cell line using two-dimensional differential gel electrophoresis. *Oncol Rep.* 16 (4): 705-711.
39. **Tardito, S. and L. Marchio.** 2009. Copper compounds in anticancer strategies. *Curr Med Chem.* 16 (11): 1325-1348.
40. **Thati, B., A. Noble, et al.** 2007. Apoptotic cell death: a possible key event in mediating the in vitro anti-proliferative effect of a novel copper(II) complex, [Cu(4-Mecdoa)(phen)(2)] (phen=phenanthroline, 4-Mecdoa=4-methylcoumarin-6,7-dioxactetate), in human malignant cancer cells. *Eur J Pharmacol.* 569 (1-2): 16-28.
41. **Thomas, C.B. & Burg, K.J.L.** 2004. Tissue Engineering Systems. In: *Absorbable and Biodegradable Polymers* (eds. WS Shalaby, KJL Burg). CRC Press LLC, Boca Raton, Florida.
42. **Tisato, F., C. Marzano, et al.** 2010. Copper in diseases and treatments, and copper-based anticancer strategies. *Med Res Rev.* 30 (4): 708-749.
43. **Valko M, Izakovic M, Mazur M, et al.** 2004. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Mol Cell Biochem.* 266: 37-56.
44. **Watanabe, Y., E. Ogo, et al.** 2011. Treatment with low-dose cyclophosphamide and radiation therapy for advanced non-small lung cancer in elderly patient. *Gan To Kagaku Ryoho.* 38 (9): 1503-1505.
45. **Weinstein, I. B., Joe, A. K.** 2006. Mechanisms of disease: Oncogene addiction a rationale for molecular targeting in cancer therapy. *Nature Clinical Practice Oncology.* 3, 448–457.

46. **Willingham AT, Deveraux QL, Hampton GM, et al.** 2004. RNAi and HTS: exploring cancer by systematic loss-of-function. *Oncogene*. 23: 8392-400.
47. **Yang, W., D. Luo, et al.** 2008. TMTP1, a novel tumor-homing peptide specifically targeting metastasis. *Clin Cancer Res*. 14 (17): 5494-5502.
48. **Yang, X. Z., S. Dou, et al.** 2011. Systemic delivery of siRNA with cationic lipid assisted PEG-PLA nanoparticles for cancer therapy. *J Control Release*. 156 (2): 203-211.
49. **Yao, C., J. Liu, et al.** 2011. Rapamycin inhibits the proliferation and apoptosis of gastric cancer cells by down regulating the expression of survivin. *Hepatogastroenterology*. 58 (107-108): 1075-1080.
50. **Yu, J. J., H. A. Lee, et al.** 2007. Bio-distribution and anti-tumor efficacy of PEG/PLA nano particles loaded doxorubicin. *J Drug Target*. 15 (4): 279-284.
51. **Zheng, J., J. R. Lou, et al.** 2010. N-Acetylcysteine interacts with copper to generate hydrogen peroxide and selectively induce cancer cell death. *Cancer Lett*. 298 (2): 186-194.
52. **Zhou B y Gitschier J.** 1997. hCTR1: a human gene for copper uptake identified by complementation in yeast. *Proc Natl Acad Sci*. 94: 7481-7486.
53. **Zille, H., J. Paquet, et al,** 2010. Evaluation of intra-articular delivery of hyaluronic acid functionalized biopolymeric nanoparticles in healthy rat knees. *Biomed Mater Eng*. 20 (3): 235-242.

IX. ANEXOS

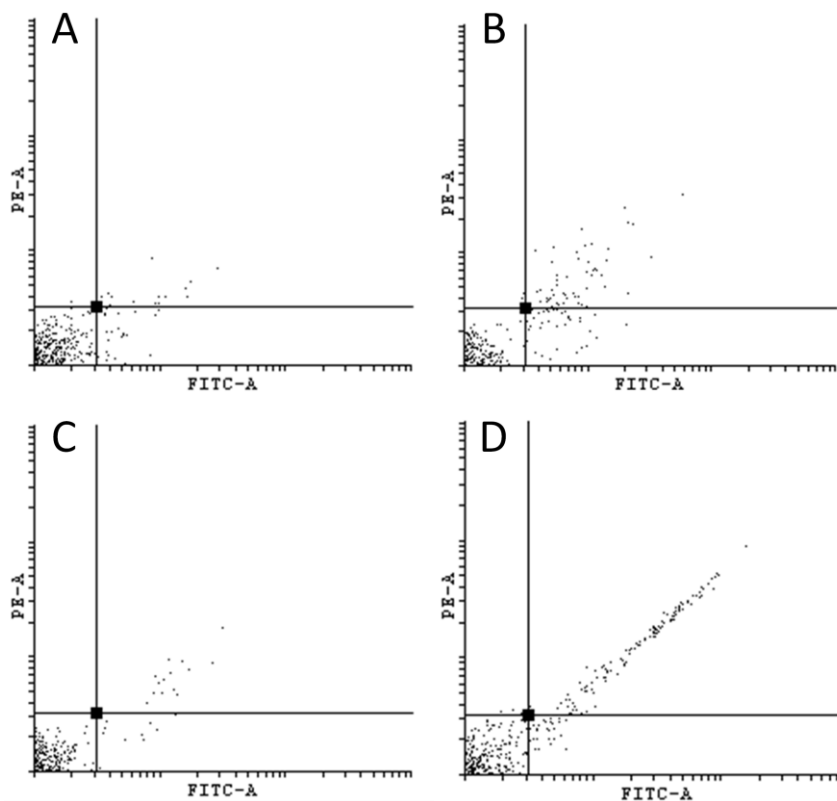


Anexo 1: Se observan los dot-plots (YOPRO-1/PI) correspondientes a células HuVEC tratadas con cobre. A) Control (-), B) 1mM, C) 10mM, D) 40mM.

A	Number	% of vis	C	Number	% of vis
Visible	10000	100	Visible	10000	100
Necrosis	11	0,11	Necrosis	151	1,51
Apop. Tardia	448	4,48	Apop. Tardia	7898	78,97
Vivas	9102	91,02	Vivas	1183	11,83
Apoptosis	439	4,39	Apoptosis	768	7,67

B	Number	% of vis	D	Number	% of vis
Visible	10000	100	Visible	10000	100
Necrosis	669	6,69	Necrosis	1329	13,29
Apop. Tardia	4590	45,9	Apop. Tardia	4109	41,09
Vivas	3356	33,56	Vivas	4476	44,76
Apoptosis	1385	13,85	Apoptosis	86	0,86

Anexo 2: Se observan los datos obtenidos a partir de los dot-plots (YOPRO-1/PI) correspondientes a células HuVEC tratadas con cobre. A) Control (-), B) 1mM, C) 10mM, D) 40mM.

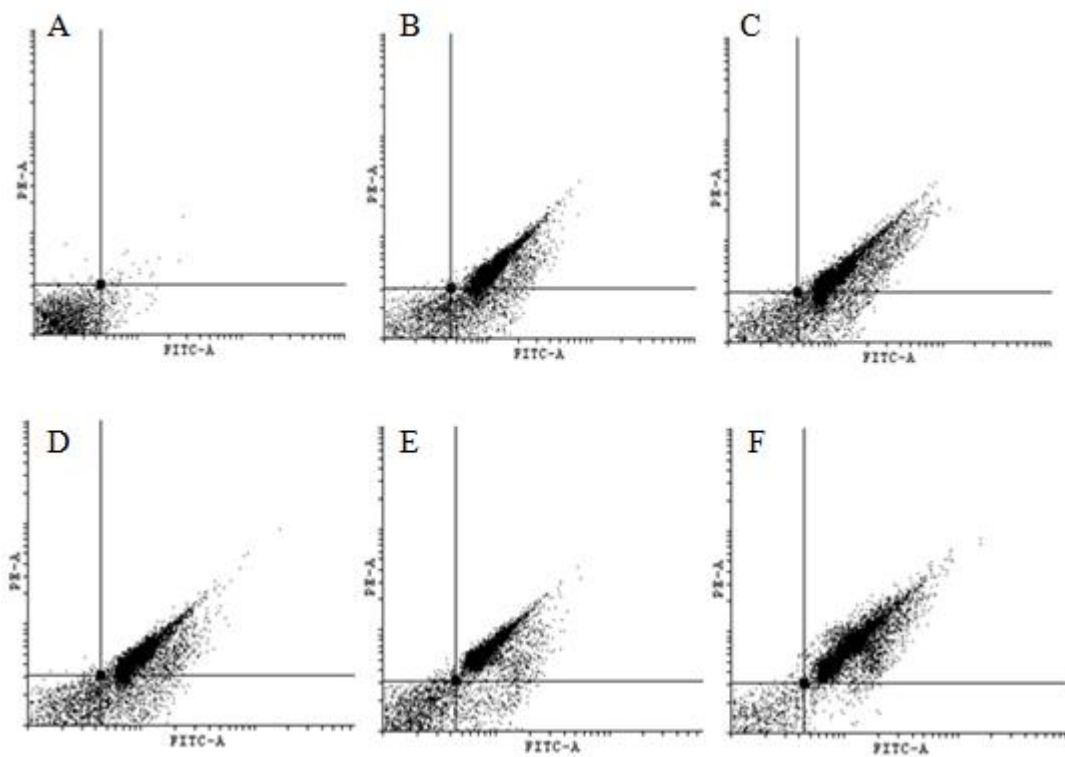


Anexo 3: Se observan los dot-plots (YOPRO-1/PI) correspondientes a células MKN tratadas con cobre. A) Control (-), B) 1mM, C) 10mM, D) 40mM.

A	Number	% of vis	C	Number	% of vis
Visible	10000	100	Visible	10000	100
Necrosis	5	0,05	Necrosis	2	0,02
Apop. Tardía	14	0,14	Apop. Tardía	14	0,14
Vivas	9936	99,36	Vivas	9969	99,69
Apoptosis	45	0,45	Apoptosis	15	0,15

B	Number	% of vis	D	Number	% of vis
Visible	10000	100	Visible	10000	100
Necrosis	3	0,02	Necrosis	5	0,05
Apop. Tardía	52	0,52	Apop. Tardía	126	1,26
Vivas	9879	98,79	Vivas	9818	98,18
Apoptosis	66	0,66	Apoptosis	51	0,51

Anexo 4: Se observan los datos obtenidos a partir de los dot-plots (YOPRO-1/PI) correspondientes a células MKN tratadas con cobre. A) Control (-), B) 1mM, C) 10mM, D) 40mM.



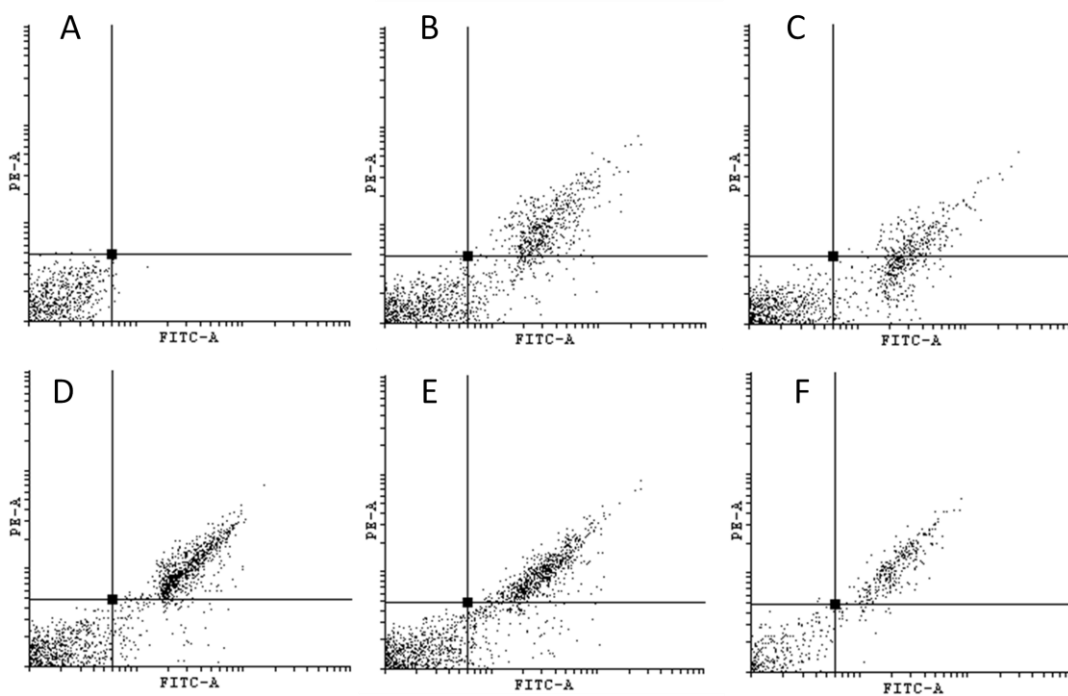
Anexo 5: Se observan los dot-plots (YOPRO-1/PI) correspondientes a células HuVEC tratadas con ácido láctico. A) Control (-), B) 0,1mM, C) 1mM, D) 10mM, E) 100mM, F) 1M.

A	Number	% of vis	D	Number	% of vis
Visible	10000	100	Visible	10000	100
Necrosis	12	0,11	Necrosis	22	0,22
Apop. Tardía	29	0,28	Apop. Tardia	5768	57,68
Vivas	9750	97,5	Vivas	3028	30,28
Apoptosis	209	2,08	Apoptosis	1182	11,82

B	Number	% of vis	E	Number	% of vis
Visible	10000	100	Visible	10000	100
Necrosis	15	0,15	Necrosis	63	0,63
Apop. Tardía	5456	54,56	Apop. Tardia	6089	60,89
Vivas	2980	29,8	Vivas	3484	34,84
Apoptosis	1549	15,49	Apoptosis	364	3,64

C	Number	% of vis	F	Number	% of vis
Visible	10000	100	Visible	10000	100
Necrosis	15	0,15	Necrosis	27	0,27
Apop. Tardía	5336	53,36	Apop. Tardia	7296	72,96
Vivas	2899	28,99	Vivas	2511	25,11
Apoptosis	1750	17,5	Apoptosis	166	1,66

Anexo 6: Se observan los datos obtenidos a partir de los dot-plots (YOPRO-1/PI) correspondientes a células HuVEC tratadas con ácido láctico. A) Control (-), B) 0,1mM, C) 1mM, D) 10mM, E) 100mM, F) 1M.



Anexo 7: Se observan los dot-plots (YOPRO-1/PI) correspondientes a células MKN tratadas con ácido láctico. A) Control (-), B) 0,1mM, C) 1mM, D) 10mM, E) 100mM, F) 1M.

A	Number	% of vis	D	Number	% of vis
Visible	10000	100	Visible	10000	100
Necrosis	4	0,04	Necrosis	0	0
Apop. Tardía	0	0	Apop. Tardía	854	8,54
Vivas	9986	99,86	Vivas	8443	84,43
Apoptosis	10	0,1	Apoptosis	703	7,03

B	Number	% of vis	E	Number	% of vis
Visible	10000	100	Visible	10000	100
Necrosis	1	0,01	Necrosis	0	0
Apop. Tardía	540	5,4	Apop. Tardía	722	7,22
Vivas	8788	87,88	Vivas	8608	86,08
Apoptosis	671	6,71	Apoptosis	670	6,7

C	Number	% of vis	F	Number	% of vis
Visible	10000	100	Visible	10000	100
Necrosis	0	0	Necrosis	2	0,02
Apop. Tardía	232	2,31	Apop. Tardía	305	3,05
Vivas	9069	90,69	Vivas	9628	96,28
Apoptosis	699	6,99	Apoptosis	65	0,65

Anexo 8: Se observan los datos obtenidos a partir de los dot-plots (YOPRO-1/PI) correspondientes a células MKN tratadas con ácido láctico. A) Control (-), B) 0,1mM, C) 1mM, D) 10mM, E) 100mM, F) 1M.

A	Number	% of vis	C	Number	% of vis
Visible	10000	100	Visible	10000	100
Necrosis	3	0,02	Necrosis	0	0
Apop. Tardía	1	0,01	Apop. Tardía	102	1,02
Vivas	9985	99,85	Vivas	9640	96,4
Apoptosis	11	0,11	Apoptosis	258	2,58

B	Number	% of vis	D	Number	% of vis
Visible	10000	100	Visible	10000	100
Necrosis	2	0,02	Necrosis	0	0
Apop. Tardía	120	1,2	Apop. Tardía	116	1,15
Vivas	9613	96,13	Vivas	9651	96,51
Apoptosis	265	2,65	Apoptosis	233	2,33

E	Number	% of vis
Visible	10000	100
Necrosis	2	0,02
Apop. Tardía	71	0,71
Vivas	9805	98,05
Apoptosis	122	1,22

Anexo 9: Se observan los datos obtenidos a partir del análisis de citotoxicidad por YOPRO-1/PI correspondientes a células HuVEC tratadas durante 24 horas. A) Control (-), B) AL 0,04mM, C) PLA 0,04mM, D) Nano-Cu 0,04mM, E) Cu 1,2mM.

A	Number	% of vis	C	Number	% of vis
Visible	10000	100	Visible	10000	100
Necrosis	3	0,02	Necrosis	6	0,05
Apop. Tardía	1	0,01	Apop. Tardía	106	1,06
Vivas	9985	99,85	Vivas	9061	90,61
Apoptosis	11	0,11	Apoptosis	827	8,27

B	Number	% of vis	D	Number	% of vis
Visible	10000	100	Visible	10000	100
Necrosis	12	0,11	Necrosis	2	0,02
Apop. Tardía	13	0,13	Apop. Tardía	47	0,47
Vivas	9948	99,48	Vivas	9826	98,26
Apoptosis	27	0,27	Apoptosis	125	1,25

E	Number	% of vis
Visible	10000	100
Necrosis	24	0,23
Apop. Tardía	211	2,11
Vivas	9630	96,3
Apoptosis	135	1,35

Anexo 10: Se observan los datos obtenidos a partir del análisis de citotoxicidad por YOPRO-1/PI correspondientes a células HuVEC tratadas durante 48 horas. A) Control (-), B) 0,1mM, C) 1mM, D) 10mM, E) 100mM, F) 1M.

A	Number	% of vis	C	Number	% of vis
Visible	10000	100	Visible	10000	100
Necrosis	3	0,02	Necrosis	4	0,04
Apop. Tardía	1	0,01	Apop. Tardía	556	5,56
Vivas	9985	99,85	Vivas	9368	93,68
Apoptosis	11	0,11	Apoptosis	72	0,72

B	Number	% of vis	D	Number	% of vis
Visible	10000	100	Visible	10000	100
Necrosis	7	0,07	Necrosis	12	0,11
Apop. Tardía	148	1,48	Apop. Tardía	49	0,49
Vivas	9130	91,3	Vivas	9912	99,12
Apoptosis	715	7,14	Apoptosis	27	0,27

E	Number	% of vis
Visible	10000	100
Necrosis	15	0,15
Apop. Tardía	118	1,18
Vivas	9749	97,49
Apoptosis	118	1,18

Anexo 11: Se observan los datos obtenidos a partir del análisis de citotoxicidad por YOPRO-1/PI correspondientes a células HuVEC tratadas durante 96 horas. A) Control (-), B) AL 0,04mM, C) PLA 0,04mM, D) Nano-Cu 0,04mM, E) Cu 1,2mM.

A	Number	% of vis	D	Number	% of vis
Visible	10000	100	Visible	10000	100
Necrosis	5	0,05	Necrosis	3	0,02
Apop. Tardía	14	0,14	Apop. Tardía	53	0,53
Vivas	9936	99,36	Vivas	9728	97,28
Apoptosis	45	0,45	Apoptosis	216	2,16

B	Number	% of vis	E	Number	% of vis
Visible	10000	100	Visible	10000	100
Necrosis	5	0,05	Necrosis	4	0,04
Apop. Tardía	742	7,42	Apop. Tardía	117	1,17
Vivas	7567	75,67	Vivas	9480	94,8
Apoptosis	1686	16,86	Apoptosis	399	3,99

C	Number	% of vis
Visible	10000	100
Necrosis	6	0,05
Apop. Tardía	105	1,05
Vivas	9451	94,51
Apoptosis	438	4,38

Anexo 12: Se observan los datos obtenidos a partir del análisis de citotoxicidad por YOPRO-1/PI correspondientes a células MKN tratadas durante 24 horas. A) Control (-), B) AL 0,04mM, C) PLA 0,04mM, D) Nano-Cu 0,04mM, E) Cu 1,2mM.

A	Number	% of vis	C	Number	% of vis
Visible	10000	100	Visible	10000	100
Necrosis	5	0,05	Necrosis	13	0,13
Apop. Tardía	14	0,14	Apop. Tardía	133	1,33
Vivas	9936	99,36	Vivas	6385	63,85
Apoptosis	45	0,45	Apoptosis	3469	34,69

B	Number	% of vis	D	Number	% of vis
Visible	10000	100	Visible	10000	100
Necrosis	104	1,04	Necrosis	10	0,1
Apop. Tardía	239	2,39	Apop. Tardía	65	0,65
Vivas	8967	89,67	Vivas	8858	88,58
Apoptosis	690	6,9	Apoptosis	1067	10,67

E	Number	% of vis
Visible	10000	100
Necrosis	36	0,36
Apop. Tardía	63	0,63
Vivas	9850	98,5
Apoptosis	51	0,51

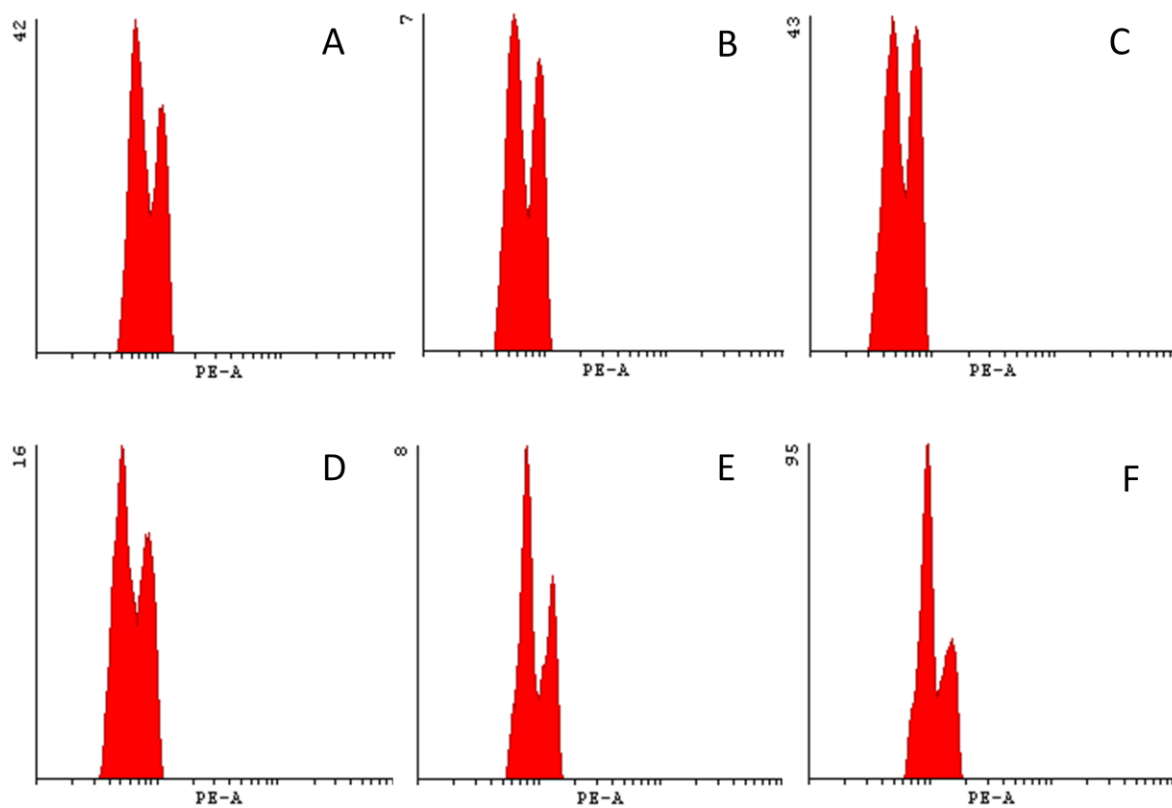
Anexo 13: Se observan los datos obtenidos a partir del análisis de citotoxicidad por YOPRO-1/PI correspondientes a células MKN tratadas durante 48 horas. A) Control (-), B) AL 0,04mM, C) PLA 0,04mM, D) Nano-Cu 0,04mM, E) Cu 1,2mM.

A	Number	% of vis	C	Number	% of vis
Visible	10000	100	Visible	10000	100
Necrosis	5	0,05	Necrosis	202	2,02
Apop. Tardía	14	0,14	Apop. Tardía	568	5,68
Vivas	9936	99,36	Vivas	8140	81,39
Apoptosis	45	0,45	Apoptosis	1090	10,9

B	Number	% of vis	D	Number	% of vis
Visible	10000	100	Visible	10000	100
Necrosis	60	0,6	Necrosis	106	1,06
Apop. Tardía	67	0,67	Apop. Tardía	307	3,07
Vivas	9709	97,09	Vivas	9117	91,17
Apoptosis	164	1,64	Apoptosis	470	4,7

E	Number	% of vis
Visible	10000	100
Necrosis	121	1,21
Apop. Tardía	106	1,06
Vivas	9709	97,09
Apoptosis	64	0,64

Anexo 14: Se observan los datos obtenidos a partir del análisis de citotoxicidad por YOPRO-1/PI correspondientes a células MKN tratadas durante 96 horas. A) Control (-), B) AL 0,04mM, C) PLA 0,04mM, D) Nano-Cu 0,04mM, E) Cu 1,2mM.



Anexo 15: Se observan los histogramas de ciclo celular correspondiente al tratamiento de 24 horas en células HuVEC. A) Control (+), B) Ac. Láctico 0,04mM, C) PLA 0,04mM, D) Nano-PLA 0,04mM, E) Nano-Cu 0,04mM, F) Cu 1,2mM

A	Number	% of vis	CV
Visible	3443	100	26,03
G1	1686	48,96	9,21
S	501	14,55	5,63
G2	1168	33,92	8,68

B	Number	% of vis	CV
Visible	539	100	23,45
G1	245	45,45	7,67
S	109	20,22	7,33
G2	185	34,32	6,63

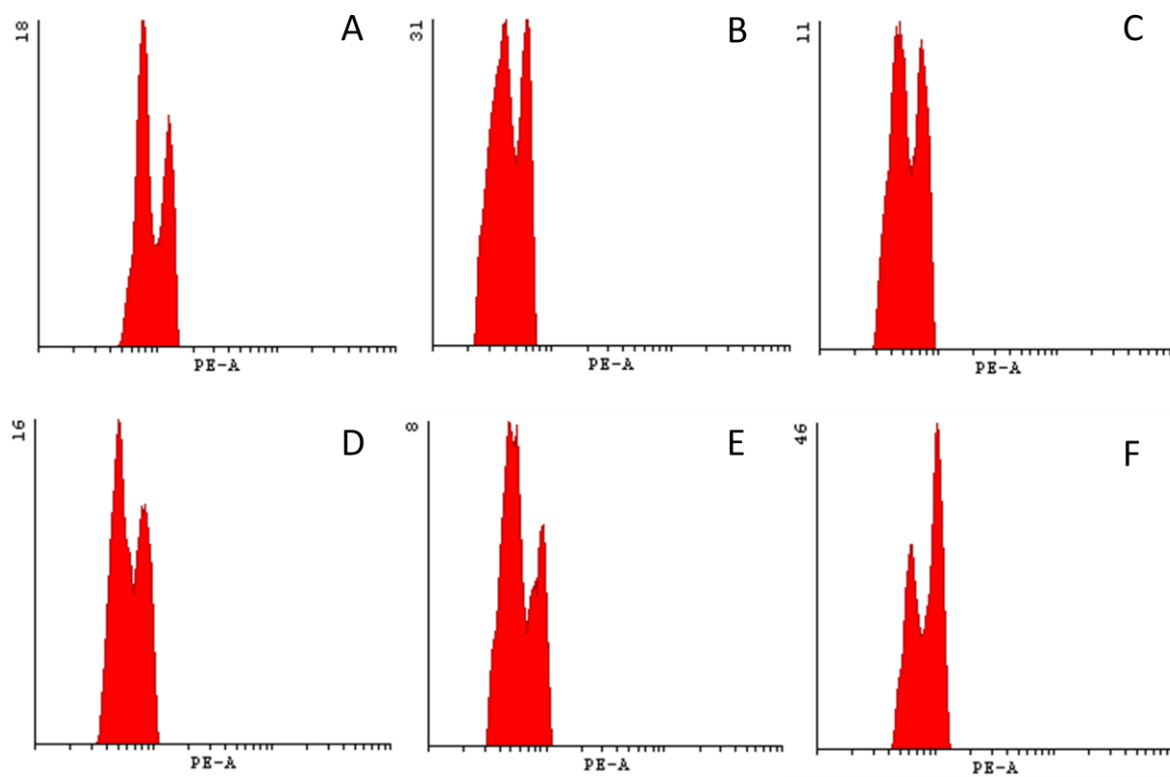
C	Number	% of vis	CV
Visible	3795	100	24,48
G1	1677	44,18	9,41
S	691	18,2	6,58
G2	1427	37,6	7,72

D	Number	% of vis	CV
Visible	3865	100	24,92
G1	2108	54,54	11,25
S	546	14,12	4,18
G2	1211	31,33	8,38

E	Number	% of vis	CV
Visible	446	100	24,18
G1	224	50,22	6,75
S	103	23,09	8,98
G2	119	26,68	5,6

F	Number	% of vis	CV
Visible	4986	100	23,38
G1	2803	56,21	7,44
S	798	16	6,65
G2	1385	27,77	7,63

Anexo 16: Se observan los datos de las distintas etapas del ciclo celular correspondiente al tratamiento de 24 horas en células HuVEC. A) Control (+), B) Ac. Láctico 0,04mM, C) PLA 0,04mM, D) Nano-PLA 0,04mM, E) Nano-Cu 0,04mM, F) Cu 1,2mM



Anexo 17: Se observan los análisis de ciclo celular correspondiente a células HuVEC pasadas 48 horas del tratamiento. A) Control (+), B) Ac. Láctico 0,04mM, C) PLA 0,04mM, D) Nano-PLA 0,04mM, E) Nano-Cu 0,04mM, F) Cu 1,2mM

A	Number	% of vis	CV
Visible	1157	100	24,42
G1	585	50,56	7,58
S	235	20,31	8,11
G2	337	29,12	5,86

B	Number	% of vis	CV
Visible	2992	100	24,6
G1	1455	48,62	10,67
S	519	17,34	5,56
G2	1018	34,02	7,18

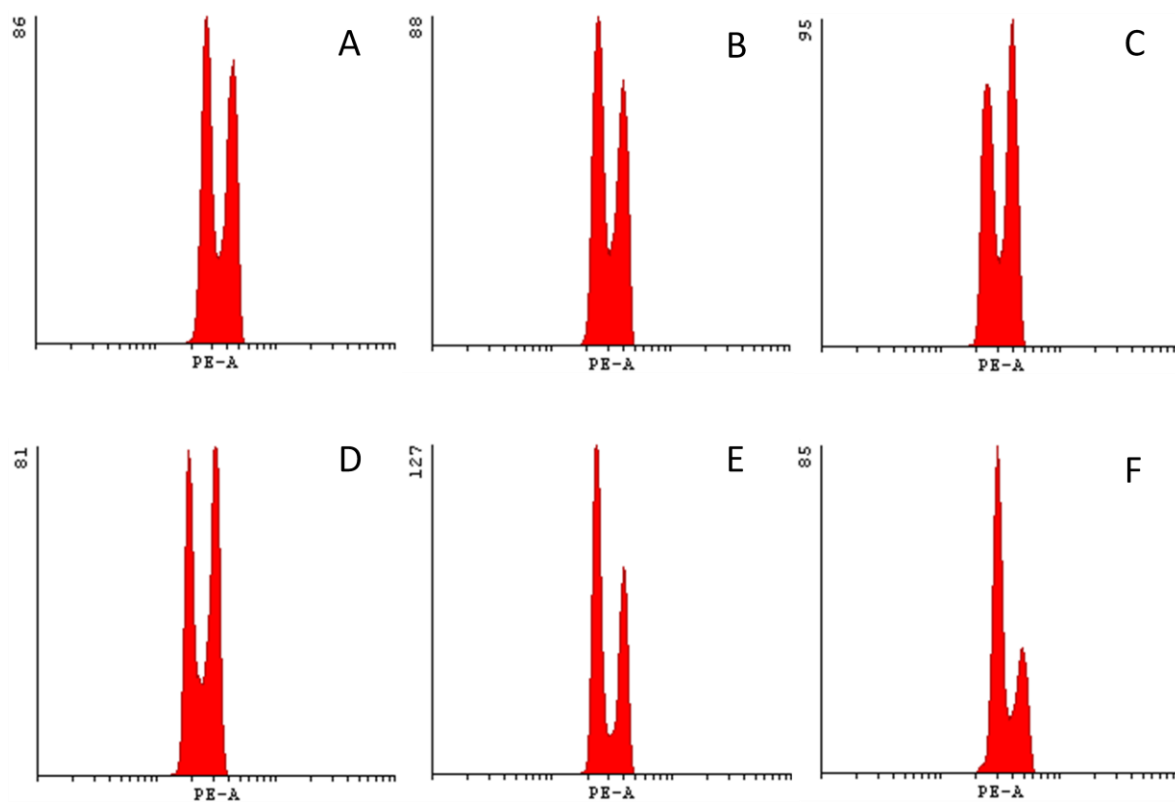
C	Number	% of vis	CV
Visible	1050	100	24,23
G1	453	43,14	8,72
S	234	22,28	7,3
G2	363	34,57	7,67

D	Number	% of vis	CV
Visible	1259	100	24,21
G1	575	45,67	8,51
S	266	21,12	6,28
G2	418	33,2	7,78

E	Number	% of vis	CV
Visible	752	100	29,12
G1	421	55,98	11,1
S	179	23,8	10,35
G2	152	20,21	6,07

F	Number	% of vis	CV
Visible	2906	100	23,18
G1	915	31,48	7,31
S	722	24,84	8,48
G2	1269	43,66	6,34

Anexo 18: Se observan los datos de las distintas etapas del ciclo celular correspondiente a células HuVEC pasadas 48 horas del tratamiento. A) Control (+), B) Ac. Láctico 0,04mM, C) PLA 0,04mM, D) Nano-PLA 0,04mM, E) Nano-Cu 0,04mM, F) Cu 1,2mM



Anexo 19: Se observan los análisis de ciclo celular correspondiente a células MKN pasadas 24 horas del tratamiento. A) Control (+), B) Ac. Láctico 0,04mM, C) PLA 0,04mM, D) Nano-PLA 0,04mM, E) Nano-Cu 0,04mM, F) Cu 1,2mM

A	Number	% of vis	CV
Visible	5391	100	23,67
G1	2285	42,38	6,11
S	922	17,1	7,88
G2	2184	40,51	6,45

B	Number	% of vis	CV
Visible	5341	100	23,14
G1	2391	44,76	5,8
S	935	17,5	7,32
G2	2015	37,72	6,38

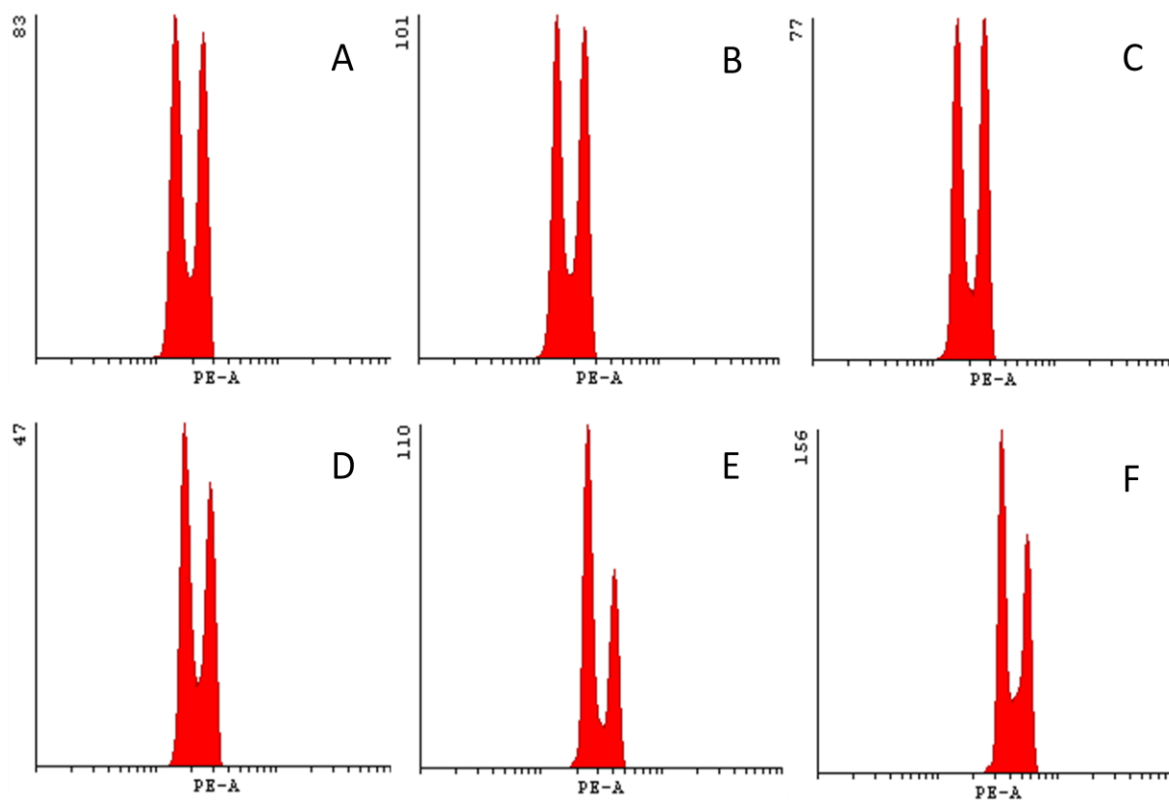
C	Number	% of vis	CV
Visible	5792	100	22,9
G1	2227	38,44	6,01
S	960	16,57	7,43
G2	2605	44,97	6,44

D	Number	% of vis	CV
Visible	4723	100	22,7
G1	1729	36,6	4,73
S	1094	23,16	9,16
G2	1900	40,22	5,02

E	Number	% of vis	CV
Visible	5376	100	24,66
G1	3002	55,84	5,23
S	815	15,15	10,26
G2	1559	28,99	4,03

F	Number	% of vis	CV
Visible	3453	100	22,49
G1	1994	57,74	5,59
S	722	20,9	9,37
G2	725	20,99	4,72

Anexo 20: Se observan los datos de las distintas etapas del ciclo celular correspondiente a células MKN pasadas 24 horas del tratamiento. A) Control (+), B) Ac. Láctico 0,04mM, C) PLA 0,04mM, D) Nano-PLA 0,04mM, E) Nano-Cu 0,04mM, F) Cu 1,2mM



Anexo 21: Se observan los análisis de ciclo celular correspondiente a células MKN pasadas 48 horas del tratamiento. A) Control (+), B) Ac. Láctico 0,04mM, C) PLA 0,04mM, D) Nano-PLA 0,04mM, E) Nano-Cu 0,04mM, F) Cu 1,2mM

A	Number	% of vis	CV
Visible	5329	100	25,09
G1	2299	43,14	6,54
S	818	15,34	8,27
G2	2212	41,5	6,6

B	Number	% of vis	CV
Visible	6063	100	24,65
G1	2487	41,01	5,94
S	994	16,39	8,22
G2	2582	42,58	6,28

C	Number	% of vis	CV
Visible	4408	100	24,23
G1	1878	42,6	5,26
S	775	17,58	9,7
G2	1755	39,81	4,96

D	Number	% of vis	CV
Visible	2601	100	22,98
G1	1234	47,44	6,26
S	446	17,14	7,55
G2	921	35,4	5,22

E	Number	% of vis	CV
Visible	4682	100	24,44
G1	2649	56,57	5,32
S	541	11,55	7,7
G2	1492	31,86	5,44

F	Number	% of vis	CV
Visible	7298	100	25,48
G1	2970	40,69	4,49
S	918	12,57	5,4
G2	2848	39,02	7,83

Anexo 22: Se observan los datos de las distintas etapas del ciclo celular correspondiente a células MKN pasadas 48 horas del tratamiento. A) Control (+), B) Ac. Láctico 0,04mM, C) PLA 0,04mM, D) Nano-PLA 0,04mM, E) Nano-Cu 0,04mM, F) Cu 1,2mM

24 Horas	Control (-)	AL	PLA	Nano-PLA	Nano-Cu	Cu
Promedio	100	100,934175	97,8092528	97,0629283	84,8374066	69,1163394
DSTD	6,832091453	7,3733487	7,19527722	6,36060232	4,59199491	5,51565962
Valor P		0,8526	0,5426	0,388	0,0001	0

48 Horas	Control (-)	AL	PLA	Nano-PLA	Nano-Cu	Cu
Promedio	100	99,4593973	91,4426281	80,5302414	62,8247245	36,1766172
DSTD	9,736012	7,83510514	6,26943681	11,9534819	8,89795586	2,95031149
Valor P		0,9045	0,0556	0,0927	0	0

96 Horas	Control (-)	AL	PLA	Nano-PLA	Nano-Cu	Cu
Promedio	100	101,312917	76,4649774	76,265762	34,3763906	14,6519021
DSTD	10,1204537	9,84622029	12,8746247	9,90991633	6,57418199	3,05269105
Valor P		0,8702	0,0058	0,003	0	0

Anexo 23: Se observan los promedios, desviación estándar y valor p para cada uno de los tratamientos de MTT en células HuVEC. Valor utilizado $p \leq 0,05$.

24 Horas	Control (-)	AL	PLA	Nano-PLA	Nano-Cu	Cu
Promedio	100	93,694925	96,8862717	116,093685	107,592567	51,6139336
DSTD	7,65260482	6,8733034	7,03337122	8,69473479	9,42672499	6,18001199
Valor P		0,2011	0,0661	0,003	0,098	0

48 Horas	Control (-)	AL	PLA	Nano-PLA	Nano-Cu	Cu
Promedio	100	86,0320545	88,3295749	73,7217376	86,044244	38,7592167
DSTD	9,89739421	10,4104319	8,49136675	4,72046085	21,9037335	6,01807535
Valor P		0,0404	0,0641	0,002	0,12	0

96 Horas	Control (-)	AL	PLA	Nano-PLA	Nano-Cu	Cu
Promedio	100	102,085057	103,306643	65,21064558	19,1753302	7,23402164
DSTD	4,17605762	5,19906995	2,69968716	4,975294713	2,5287078	1,14257279
Valor P		0,2956	0,0728	0	0	0

Anexo 24: Se observan los promedios, desviación estándar y valor p para cada uno de los tratamientos de MTT en células MKN. Valor utilizado $p \leq 0,05$.