



Universidad Nacional del Litoral
Facultad de Ciencias Veterinarias

*Centro de Medicina Comparada (CMC)- Instituto de Ciencias Veterinarias
del Litoral (ICIVET-UNL CONICET)*

*Tesis presentada para optar por el grado académico de
Doctora en Ciencias Veterinarias*

**Implementación de ensayos *in vitro* para la
determinación de citotoxicidad y genotoxicidad de
nuevos compuestos durante la evaluación preclínica**

Autora: Lic. Fátima Belén Gasser
Directora: Dra. Ma. Eugenia Baravalle
Codirectora: Dra. Belkis Ester Marelli

Año: 2026

“El conocimiento es la mejor inversión que se puede hacer”

Abraham Lincoln

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, que con su amor, paciencia y ejemplo fueron el sostén de cada paso de mi formación. Como escribió Isaac Newton: *“Si he visto más lejos, es porque estoy sentado sobre los hombros de gigantes”*. Esta frase refleja lo que ustedes significan en mi vida: mi impulso, mi base y mi guía.

A mi hermana, Eva, por impulsar y creer en mí, por estar y acompañar. Simplemente gracias.

A Agustín y Olivia, mis sobrinos y compañeros de viaje en esta etapa, por enseñarme la simpleza de las cosas y mirarme siempre como un “cerebritito”, recordándome que todo esfuerzo vale la pena.

A Juan, mi esposo y compañero de vida. Gracias por tu amor, tu paciencia y tu aguante durante todos estos años. Gracias por comprender mis tiempos y mi disfrute por la ciencia. ¡Simplemente gracias, amor!

A Euge, mi directora, infinitas gracias. Gracias por tu enseñanza y dedicación no solo en este trabajo, sino en cada etapa de mi formación. Gracias por haber confiado en mí desde el primer momento, por impulsarme a crecer, por tu paciencia infinita y por tu guía generosa y desinteresada. Gracias por haberme formado con rigor científico, pero también con humanidad, por transmitirme valores, pasión por la ciencia y compromiso con el trabajo bien hecho. Gracias por estar siempre presente, acompañando cada avance, cada duda y cada tropiezo, incluso en la mesada. Y gracias, sobre todo, por compartir charlas, mates y tiempo de calidad, que hicieron de este camino no solo un proceso académico, sino una experiencia profundamente humana. Todo lo que soy hoy como profesional tiene, sin dudas, mucho de tu impronta.

A Belkis, mi codirectora, infinitas gracias por acompañarme durante todo este camino, por tu constante disposición y dedicación, tanto en el desarrollo de este trabajo como en mi formación profesional. Gracias por acompañar de cerca cada etapa.

A Sol, infinitas gracias. Gracias por dedicar tu tiempo a enseñarme y explicarme con tanta generosidad gran parte de lo desarrollado en este trabajo; por ponerte siempre a la par mío en la mesada para poner a punto técnicas que ninguna de las dos conocía, enfrentando cada desafío con compromiso y entusiasmo. Gracias por soportar mis mil y una consultas, por tener siempre una mano dispuesta a ayudar y una palabra justa en el momento indicado. Y gracias, especialmente, por tu calidez humana, tu compañerismo y tu cariño infinito. Es un verdadero placer trabajar a la par tuyo y compartir este camino.

A Anto, infinitas gracias por tu ayuda desinteresada y por estar siempre dispuesta a resolver mis dudas y consultas. Gracias por enseñar sin guardarte nada, un placer trabajar a la par tuyo.

A Flor Olmos, técnica del citómetro y de cultivos, gracias por el tiempo dedicado a cada uno de los ensayos que realicé y por tu buena onda. Gracias por ponerte a la par.

A mis amigos de la peña del CMC (Flor, Facu, Cande, Marce, Pauli, Tulio, Enzo y Quique), gracias por hacer que todo transcurra de forma más liviana, por tener siempre

un oído dispuesto a escuchar y alentar. Gracias por tender una mano cuando hizo falta, por el tiempo compartido, los mates, las charlas y por hacer más ameno el trabajo de cada día. ¡Simplemente, gracias!

A mis amigas Biotec preseteadas (Silchu, Caro, Sofi, Luci, Vale y Daia). Gracias por el aguante, por acompañar crisis y festejos, y por estar ahí siempre. Gracias por los mates, las charlas, las comiditas y el tiempo de calidad compartido. ¡Simplemente, gracias!

A todos mis compañeros del CMC y del LBCMA, y especialmente a quienes compartieron y comparten oficina conmigo, gracias por tantas horas de trabajo compartidas, por respetar los silencios y por las charlas que sostienen, los mates, los protocolos y cada uno de los momentos vividos. De cada uno aprendí algo, y, sobre todo, aprendí a trabajar en equipo.

A Lucas Ribas, Julia Oggero, Gustavo Hein, Victoria Valliard y Santiago Valliard, gracias por su aporte a mi formación, por su disposición para trabajar en equipo y por colaborar en la puesta a punto de este trabajo. ¡Simplemente, gracias!

A Hugo Ortega, por la confianza depositada en mí para la realización de este trabajo, por acompañar de cerca este proyecto y por su predisposición para resolver cada inquietud que surgió a lo largo del proceso. ¡Gracias!

A Hugo Ortega y Natalia Salvetti, por brindarme la posibilidad de realizar la tesis en Centro de Medicina Comparada del ICiVet Litoral (UNL-CONICET) y permitirme formar parte de este gran grupo de trabajo. Este trabajo no hubiera sido posible sin el equipo humano que me acompañó en cada etapa. Gracias por hacer de este recorrido científico una experiencia profundamente compartida, donde el conocimiento creció al mismo tiempo que los vínculos.

A la Facultad de Ciencias Veterinarias y a la Universidad Nacional del Litoral por brindarme la posibilidad de seguir formándome como profesional.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por otorgarme la beca que me permitió realizar los estudios de posgrado en la carrera de Doctorado en Ciencias Veterinarias

A todos infinitamente... ¡GRACIAS!

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	I
ÍNDICE DE TABLAS.....	XI
ABREVIATURAS	XII
RESUMEN	XIV
ABSTRACT	XV
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 INTRODUCCIÓN GENERAL	2
1.2 MARCO TEORICO.....	4
1.2.1 Fármacos y estudios preclínicos.....	4
1.2.2 Métodos alternativos	5
1.2.3 Cultivo celular- Líneas celulares	6
1.2.4 Toxicología genética	10
1.2.5 Regulación	13
1.2.5.1 Organismos Reguladores y de Validación de métodos alternativos	14
1.2.6 Biomarcadores.....	15
1.2.6.1 Viabilidad celular	17
1.2.6.2 Evaluación del ciclo celular	19
1.2.6.3 Muerte celular por apoptosis y necrosis	22
1.2.6.4 Detección de caspasa-3 activa	23
1.2.6.5 Evaluación de la producción de especies reactivas del oxígeno	25
1.2.6.6 Detección de histona H2AX fosforilada (γ H2AX)	27
1.2.6.7 Evaluación de frecuencia de micronúcleos.....	29
1.2.6.8 Electroforesis en gel de células individuales o ensayo cometa ..	31
2. HIPOTESIS Y OBJETIVOS	30
2.1 HIPÓTESIS	35
2.2 OBJETIVOS	36
2.2.1 OBJETIVO GENERAL	36
2.2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	36
3. MATERIALES Y MÉTODOS	32
3.1 LÍNEAS CELULARES	38
3.2 MANTENIMIENTO DE CULTIVOS CELULARES.....	38
3.3 COMPUESTOS EN ESTUDIO	38
3.3.1 U-Omp19	39
3.3.2 BSY02.....	39
3.4 DISEÑO EXPERIMENTAL GENERAL	40
3.5 ENSAYO DE VIABILIDAD CELULAR (MTT)	42
3.5.1 Condiciones experimentales evaluadas por tratamiento y por línea celular	42

3.5.1.1 U-Omp19	42
3.5.1.1.1 Línea celular CHO-K1:	43
3.5.1.1.2 Línea celular A549:	43
3.5.1.2 BSY02	43
3.5.1.2.1 Línea celular CHO-K1:	43
3.5.1.2.2 Línea celular A549:	43
3.6 EVALUACIÓN DE LOS MECANISMOS DE MUERTE CELULAR: APOPTOSIS Y NECROSIS	44
3.7 DETECCIÓN DE CASPASA-3 ESCINDIDA.....	44
3.8 ESTUDIO DE LA PROGRESIÓN DEL CICLO CELULAR.....	45
3.9 ESTUDIO DE LA PRODUCCIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DEL OXÍGENO	46
3.10 DETERMINACIÓN DE γ H2AX COMO BIOMARCADOR DE ROTURAS DE DOBLE CADENA DE ADN	46
3.11 ESTUDIO DE LA FRECUENCIA DE MICRONÚCLEOS CON BLOQUEO DE CITOCINESIS	47
3.12 ESTUDIO DE LA INDUCCIÓN DE RUPTURAS DE CADENA SIMPLE EN EL ADN MEDIANTE EL ENSAYO COMETA ALCALINO.....	49
3.13 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	51
4. RESULTADOS	47
4.1 ESTUDIO IN VITRO DE CITOTOXICIDAD Y GENOTOXICIDAD DEL ADYUVANTE U-OMP19.....	53
4.1.a Línea celular CHO-K1	53
4.1.a.1 Estudio de la viabilidad celular	53
4.1.a.2 Evaluación de los mecanismos de muerte celular: apoptosis y necrosis.....	54
4.1.a.3 Estudio de la caspasa-3 escindida	56
4.1.a.4 Estudio de la progresión del ciclo celular.....	57
4.1.a.5 Estudio de la producción de especies reactivas del oxígeno.....	58
4.1.a.6 Determinación de γ H2AX como biomarcador de roturas de doble cadena de ADN	59
4.1.a.7 Estudio de la frecuencia de micronúcleos en presencia de citocalasina-B.....	60
4.1.a.8 Estudio de la inducción de rupturas de cadena simple en el ADN	62
4.1.b Resultados obtenidos en la línea celular A549	65
4.1.b.1 Estudio de la viabilidad celular	65
4.1.b.2 Evaluación de los mecanismos de muerte celular: apoptosis y necrosis.....	66
4.1.b.3 Evaluación de la activación de la caspasa-3	67
4.1.b.4 Estudio de la progresión del ciclo celular.....	67
4.1.b.5 Estudio de la producción de especies reactivas del oxígeno.....	69
4.1.b.6 Determinación de γ H2AX como biomarcador de roturas de doble cadena de ADN	70
4.1.b.7 Estudio de la frecuencia de MN en presencia de citocalasina-B	71

4.1.b.8 Estudio de la inducción de rupturas de cadena simple en el ADN	73
4.2 ESTUDIO IN VITRO DE CITOTOXICIDAD Y GENOTOXICIDAD DE BSY02	76
4.2.a Resultados obtenidos en la línea celular CHO-K1	76
4.2.a.1 Evaluación de la viabilidad celular mediante el ensayo de MTT.	76
4.2.a.2 Evaluación de los mecanismos de muerte celular: apoptosis y necrosis	77
4.2.a.3 Evaluación de la activación de la caspasa-3	78
4.2.a.4 Estudio de la progresión del ciclo celular.....	79
4.2.a.5 Estudio de la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS)	81
4.2.a.6 Determinación de γ H2AX como biomarcador de roturas de doble cadena de ADN	82
4.2.a.7 Estudio de la frecuencia de micronúcleos en presencia de citocalasina-B	83
4.2.a.8 Estudio de la inducción de rupturas de cadena simple en el ADN	85
4.2.b Resultados obtenidos en la línea celular A549	88
4.2.b.1 Estudio de la viabilidad celular mediante el ensayo del MTT	88
4.2.b.2 Estudio de la de muerte celular por apoptosis/necrosis	89
4.2.b.3 Evaluación de la activación de la caspasa-3	90
4.2.b.4 Estudio de la progresión del ciclo celular.....	91
4.2.b.5 Estudio de la producción de especies reactivas del oxígeno.....	93
4.2.b.6 Determinación de γ H2AX como biomarcador de roturas de doble cadena de ADN	94
4.2.b.7 Estudio de la frecuencia de MN en presencia de citocalasina-B	95
4.2.b.8 Estudio de la inducción de rupturas de cadena simple en el ADN	97
5. DISCUSIÓN	959
6. CONCLUSIONES.....	10416
7. BIBLIOGRAFÍA	10619

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Etapas del proceso de descubrimiento y desarrollo de fármacos. Creada con BioRender (www.biorender.com)	4
Figura 2. Curva de crecimiento típica de una línea celular in vitro, expresada como número de células por mililitro (en escala logarítmica) en función del tiempo (días) transcurridos desde el subcultivo. Se distinguen la fase de latencia (fase lag), la fase exponencial y la fase estacionaria. Adaptado de Freshney, 2006.	9
Figura 3. Esquema del principio del ensayo MTT. El compuesto de tetrazolio MTT es reducido por la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa (SDH) presente en células metabólicamente activas, generando formazán, un producto insoluble de color púrpura.	19
Figura 4. Esquema del ciclo celular y sus puntos de control. El ciclo celular está compuesto por las fases G_1 , S, G_2 y M, con puntos de control específicos (G_1/S , G_2/M y M/G_1) que aseguran la correcta progresión y replicación del ADN. Algunas células pueden salir temporalmente del ciclo y entrar en la fase G_0 , un estado de reposo reversible. Figura creada con BioRender (www.biorender.com).	20
Figura 5. Análisis del ciclo celular mediante citometría de flujo. El gráfico muestra la distribución de una población celular en las distintas fases del ciclo celular según el contenido de ADN. El eje x representa la cantidad relativa de ADN ($2n-4n$) y el eje y el número de células. Las células en G_0/G_1 presentan un contenido diploide ($2n$), mientras que aquellas en fase S muestran un aumento progresivo en el contenido de ADN debido a la replicación. Las células en G_2/M poseen un contenido tetraploide ($4n$), correspondiente a las fases finales del ciclo antes de la división celular (Darzynkiewicz et al., 2017).....	21
Figura 6. Marcación celular con Anexina V-FITC y yoduro de propidio (IP) para la evaluación de mecanismos de muerte celular. En las células viables, la fosfatidilserina se encuentra en la cara interna de la membrana plasmática (células Anexina-FITC negativas, IP negativas). Durante la apoptosis temprana, la fosfatidilserina se externaliza y puede ser reconocida por la Anexina V-FITC, sin pérdida de la integridad de membrana (células Anexina-FITC positivas, IP negativas). En la apoptosis tardía o necrosis, además de la unión de Anexina V-FITC, el IP penetra en la célula debido al daño de la membrana plasmática, indicando pérdida de viabilidad celular (células Anexina-FITC positivas, IP positivas). Figura creada con BioRender (www.biorender.com).....	23
Figura 7. Vías extrínseca e intrínseca de la apoptosis y su convergencia en la activación de caspasas efectoras. En la vía extrínseca, la unión de ligandos de muerte (como TNF-	

α , FASL o TRAIL) a sus receptores específicos (TNFR1, FAS, DRS) conduce a la formación del complejo DISC y a la activación de las procaspasas-8 y -10. Estas, a su vez, activan a la caspasa-3 y -7, o bien escinden a BID generando tBID, que conecta con la vía intrínseca. En la vía intrínseca, diversos estímulos letales (daño al ADN, estrés del retículo endoplásmico, hipoxia o estrés metabólico) inducen la activación de las proteínas proapoptóticas BAX y BAK, lo que provoca la permeabilización de la membrana mitocondrial externa (MOMP) y la liberación de citocromo c y SMAC. El citocromo c se une a APAF1 formando el apoptosoma, que activa a la caspasa-9, iniciando así la cascada de caspasas efectoras (3 y 7). Ambas vías convergen en la activación de la caspasa-3, evento clave que desencadena los cambios morfológicos y bioquímicos característicos de la apoptosis. Adaptado de Wani et al., 2023..... 25

Figura 8. Representación conceptual de la transducción de señales y el papel central de γ H2AX en la respuesta al daño del ADN. El daño en el ADN es detectado de manera rápida por sensores como H2AX, que activan transductores clave, entre ellos ATM, ATR, Chk1 y Chk2. Estas quinasas de punto de control transmiten las señales a moléculas efectoras como p53, p21 y cdc25, que regulan la respuesta celular, determinando si la célula detiene su ciclo, inicia la reparación del ADN o entra en apoptosis. Adaptado de Kopp et al., 2019..... 28

Figura 9. Esquema representativo del armado de conos para la cito-centrifugación. El conjunto se compone de: (1) clip de sujeción, (2) portaobjeto, (3) papel de filtro y (4) tubo contenedor. El montaje permite la correcta recolección y adhesión de las células sobre el portaobjeto durante la cito-centrifugación..... 48

Figura 10. Microfotografías representativas de células CHO-K1 luego de 48 h de exposición a distintas concentraciones de U-Omp19 obtenidas utilizando un microscopio Zeiss Axio Observer con un objetivo de 10X..... 53

Figura 11. Evaluación de la viabilidad celular de células CHO-K1 tras 48 h de exposición a U-Omp19, DOX y MMC mediante el ensayo MTT. Los datos se expresan como porcentaje de viabilidad celular respecto al control sin tratamiento (100%), representados como la media $\pm$ desviación estándar. La línea punteada indica el umbral del 70% de viabilidad celular, establecido por ISO 10993-5:2009 como valor de referencia para indicar potencial citotóxico. El símbolo (*) y (°) indica diferencia significativa ($p < 0,05$) respecto al control negativo, correspondiendo (*) a DOX, (#) a MMC..... 54

Figura 12. Evaluación del efecto de U-Omp19 sobre la muerte celular por apoptosis/necrosis en células CHO-K1. Las células fueron incubadas durante 48 h con U-Omp19 (100 μ g/ml) y posteriormente analizadas por citometría de flujo mediante

tinción con Anexina V-FITC/PI. Las barras representan los porcentajes de células viables, en apoptosis temprana (Ap. Temprana), en apoptosis tardía (Ap. Tardía) y en necrosis. Las células control se cultivaron en medio DMEM-F12-SFB, mientras que DOX y H₂O₂ se utilizaron como controles positivos de apoptosis. Los valores se expresan como media $\pm$ desviación estándar. El símbolo (*) indica diferencia significativa ($p < 0,05$) respecto a las células control; ns: diferencia no significativa ($p > 0,05$)..... 55

Figura 13. Evaluación de la caspasa-3 escindida en células CHO-K1 tratadas con U-Omp19. Las células CHO-K1 fueron incubadas durante 48 h con U-Omp19 (100 μ g/ml), Doxorubicina (DOX, 50 μ g/ml; control positivo) o medio DMEM-F12-SFB (células control, sin tratamiento). La cantidad de caspasa-3 escindida se determinó por citometría de flujo. Los resultados se presentan como media $\pm$ desviación estándar del porcentaje de células con caspasa-3 activa respecto a las células control. El símbolo (*) indica diferencias significativas respecto a las células control ($p < 0,05$), ns: diferencia no significativa ($p > 0,05$)..... 56

Figura 14. Análisis del ciclo celular en células CHO-K1 tratadas con U-Omp19 mediante citometría de flujo. Los histogramas representan la distribución de las células en las distintas fases del ciclo celular (G0/G1, S y G2/M) según el contenido de ADN, determinado mediante tinción con ioduro de propidio (IP) luego de 48 h de tratamiento con U-Omp19. Se incluyen células control (células sin tratar) y controles positivos tratados con MMC (0,5 μ g/ml) y DOX (14 μ g/ml). 57

Figura 15. Porcentaje de células CHO-K1 en las distintas fases del ciclo celular (G0/G1, S y G2/M) luego de 48 h de tratamiento con U-Omp19 (100 μ g/ml), MMC (0,5 μ g/ml) y DOX (14 μ g/ml) y células control (medio de cultivo, sin tratamiento). Los porcentajes de células en cada fase se determinaron por citometría de flujo luego de tinción con ioduro de propidio (IP). Los valores se expresan como media $\pm$ desviación estándar. El símbolo (*) indica diferencia significativa ($p < 0,05$) respecto a las células control; ns: no significativo ($p > 0,05$)..... 58

Figura 16. Evaluación de la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) en células CHO-K1 tratadas con U-Omp19 (100 μ g/ml), DOX (50 μ g/ml) y H₂O₂ (5%). El porcentaje de células ROS positivas se determinó mediante tinción con hidroetidina (HE) y análisis por citometría de flujo. Los valores se expresan como media $\pm$ desviación estándar. El símbolo (*) indica diferencias significativas con respecto a las células control ($p < 0,05$), ns: diferencia no significativa ($p > 0,05$)..... 59

Figura 17. Detección de daño en el ADN mediante cuantificación de γ H2AX en células CHO-K1. Porcentaje de células positivas para γ H2AX (%) después de 48 h de tratamiento con U-Omp19 (100 μ g/ml) y BLM (100 μ g/ml, control positivo), analizado por

citometría de flujo. Los valores se expresan como media $\pm$ desviación estándar. El símbolo (*) indica diferencias significativas respecto al control ($p < 0,05$), ns: diferencia no significativa ($p > 0,05$)..... 60

Figura 18. Ensayo de MN con bloqueo de la citocinesis (CBMN) en células CHO-K1. Imágenes representativas de células binucleadas obtenidas tras 48 h de exposición a los diferentes tratamientos: control, U-Omp19, mitomicina C (MMC) y bleomicina (BLM). Las preparaciones fueron teñidas con Giemsa al 10% y observadas con un microscopio Zeiss Axioscope 7 con un objetivo de 20X. En los recuadros se muestran ampliaciones donde se destacan células binucleadas con (flechas negras) y sin micronúcleos..... 61

Figura 19. Frecuencia de micronúcleos (%MN) en células CHO-K1 tras 48 h de exposición a U-Omp19, BLM y MMC. Los resultados se expresan como porcentaje de micronúcleos (%MN) en células binucleadas, representados como media $\pm$ desviación estándar. El símbolo (*) indica diferencias significativas respecto a las células control ($p < 0,05$); ns: diferencias no significativas ($p > 0,05$). 62

Figura 20. Microfotografías representativas del ensayo cometa en células CHO-K1 tras 48 h de exposición a U-Omp19, bleomicina (BLM) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Las células fueron teñidas con DAPI observadas mediante microscopía de fluorescencia utilizando el microscopio Zeiss Axio Observer con un objetivo de 20X. 63

Figura 21. Evaluación del daño en el ADN mediante ensayo cometa en células CHO-K1 tras 48 h de tratamiento con U-Omp19 (100 μ g/ml), BLM (100 μ g/ml) durante 48 h, y H_2O_2 (100 μ M) durante 15 min. El porcentaje de ADN en la cola se utilizó como parámetro cuantitativo del daño genotóxico. Los resultados se expresan como media $\pm$ desviación estándar. El símbolo (*) indica diferencias significativas en comparación con las células control ($p < 0,05$), ns: diferencia no significativa ($p > 0,05$)..... 64

Figura 22. Evaluación de la viabilidad celular de células A549 tras 48 h de exposición a U-Omp19, DOX, MMC y BLM mediante el ensayo de MTT. Los datos se expresan como porcentaje de viabilidad celular respecto al control sin tratamiento (100%), representados como la media $\pm$ desviación estándar, de al menos tres experimentos independientes. La línea punteada indica el umbral del 70% de viabilidad celular, establecido por ISO 10993-5:2009 como valor de referencia para indicar potencial citotóxico. El símbolo (*), (#) y (°), indica diferencia significativa ($p < 0,05$) respecto al control negativo, correspondiendo (*) a DOX, (#) a MMC y (°) a BLM. 65

Figura 23. Evaluación del efecto de U-Omp19 sobre la muerte celular por apoptosis/necrosis en células A549. Las células fueron incubadas durante 48 h con U-Omp19 (100 μ g/ml) y posteriormente analizadas por citometría de flujo mediante tinción con Anexina V-FITC/PI. Las barras representan los porcentajes de células viables, en

apoptosis temprana (Ap. Temprana), en apoptosis tardía (Ap. Tardía) y en necrosis. Las células control se cultivaron en medio DMEM-F12-SFB, mientras que DOX y H₂O₂ se utilizaron como controles positivos de apoptosis. Los valores se expresan como media $\pm$ desviación estándar. El símbolo (*) indica diferencia significativa ($p < 0,05$) respecto a las células control; ns: diferencia no significativa ($p > 0,05$). 66

Figura 24. Evaluación de la caspasa-3 escindida en células A549 tratadas con U-Omp19. Las células A549 fueron incubadas durante 48 h con U-Omp19 (100 μ g/ml), Doxorubicina (DOX, 50 μ g/ml; control positivo) o medio DMEM-F12-SFB (células control, sin tratamiento). La cantidad de caspasa-3 escindida se determinó por citometría de flujo. Los resultados se presentan como media $\pm$ desviación estándar del porcentaje de células con caspasa-3 activa respecto a las células control. El símbolo (*) indica diferencias significativas respecto a las células control ($p < 0,05$), ns: diferencia no significativa ($p > 0,05$). 67

Figura 25. Análisis del ciclo celular en células A549 tratadas con U-Omp19 mediante citometría de flujo. Los histogramas representan la distribución de las células en las distintas fases del ciclo celular (G0/G1, S y G2/M) según el contenido de ADN, determinado mediante tinción con ioduro de propidio (IP) luego de 48 h de tratamiento con U-Omp19. Se incluyen células control (células sin tratar) y control positivo tratado con MMC (0,5 μ g/ml). 68

Figura 26. Porcentaje de células A549 en las distintas fases del ciclo celular (G0/G1, S y G2/M) luego de 48h de tratamiento con U-Omp19 (100 μ g/ml), MMC (0,05 μ g/ml, control positivo) y células control. Los porcentajes de células en cada fase se determinaron por citometría de flujo luego de tinción con ioduro de propidio (IP). Los valores se expresan como media $\pm$ desviación estándar. El símbolo (*) indica diferencia significativa respecto al control ($p < 0,05$), ns: diferencias no significativas ($p > 0,05$). 69

Figura 27. Evaluación de la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) en células A549 tratadas con U-Omp19 (100 μ g/ml), DOX (50 μ g/ml) y H₂O₂ (5%). El porcentaje de células ROS positivas se determinó mediante tinción con hidroetidina (HE) y análisis por citometría de flujo. Los valores se expresan como media $\pm$ desviación estándar. El símbolo (*) indica diferencias significativas con respecto a las células control ($p < 0,05$), ns: diferencia no significativa ($p > 0,05$). 70

Figura 28. Detección de daño en el ADN mediante cuantificación de γ H2AX en células A549. Porcentaje de células A549 positivas para γ H2AX (%) después de 48 h de tratamiento con U-Omp19 (100 μ g/ml) y BLM (100 μ g/ml, control positivo analizado por citometría de flujo. Los valores se expresan como media $\pm$ desviación estándar. El

símbolo (*) indica diferencias significativas respecto al control ($p < 0,05$), ns: diferencia no significativa ($p > 0,05$). 71

Figura 29. Ensayo de micronúcleos con bloqueo de la citocinesis (CBMN) en células A549. Imágenes representativas de células binucleadas obtenidas tras 48 h de exposición a los diferentes tratamientos: control, U-Omp19 y bleomicina (BLM). Las preparaciones fueron teñidas con Giemsa al 10% y observadas con un microscopio Zeiss Axioscope 7. En los recuadros se muestran ampliaciones donde se destacan células binucleadas con (flechas negras) y sin micronúcleos con un objetivo de 20X. 72

Figura 30. Frecuencia de micronúcleos (%MN) en células A549 tras 48 h de exposición a U-Omp19 y BLM. Los resultados se expresan como porcentaje de micronúcleos (%MN) en células binucleadas, representados como media $\pm$ desviación estándar. El símbolo (*) indica diferencias significativas respecto a las células control ($p < 0,05$); ns: diferencias no significativas ($p > 0,05$). 73

Figura 31. Microfotografías representativas del ensayo cometa en células A549 tras 48 h de exposición a U-Omp19 y peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Las células fueron teñidas con DAPI y observadas mediante microscopía de fluorescencia utilizando el microscopio Zeiss Axio Observer con un objetivo de 20X..... 74

Figura 32. Evaluación del daño en el ADN mediante ensayo cometa en células A549 tras 48 h de tratamiento con U-Omp19 (100 μ g/ml) durante 48 h, y H_2O_2 (100 μ M) durante 15 min. El porcentaje de ADN en la cola se utilizó como parámetro cuantitativo del daño genotóxico. Los resultados se expresan como media $\pm$ desviación estándar. El símbolo (*) indica diferencias significativas en comparación con las células control ($p < 0,05$), ns: diferencia no significativa ($p > 0,05$). 75

Figura 33. Microfotografías representativas de células CHO-K1 luego de 48 h de exposición a diferentes concentraciones de BSY02 obtenidas utilizando un microscopio Zeiss Axio Observer con un objetivo de 10X..... 76

Figura 34. Evaluación de la viabilidad celular de células CHO-K1 tras 48 h de exposición a BSY02, DOX, MMC mediante el ensayo de MTT. Los datos se expresan como porcentaje de viabilidad celular respecto al control sin tratamiento (100%), representados como la media $\pm$ desviación estándar, de al menos tres experimentos independientes. La línea punteada indica el umbral del 70% de viabilidad celular, establecido por ISO 10993-5:2009 como valor de referencia para indicar potencial citotóxico. El símbolo (*) y (°) indica diferencia significativa ($p < 0,05$) respecto al control negativo, correspondiendo (*) a DOX y (°) a MMC..... 77

Figura 35. Evaluación del efecto de BSY02 sobre la muerte celular por apoptosis/necrosis en células CHO-K1. Las células fueron incubadas durante 48 h con

BSY02 (0,34 $\mu\text{g/ml}$) y posteriormente analizadas por citometría de flujo mediante tinción con Anexina V-FITC/PI. Las barras representan los porcentajes de células viables, en apoptosis temprana (Ap. Temprana), en apoptosis tardía (Ap. Tardía) y en necrosis. Las células control se cultivaron en medio DMEM-F12-SFB, mientras que DOX y H_2O_2 se utilizaron como controles positivos de apoptosis. Los valores se expresan como media $\pm$ desviación estándar. El símbolo (*) indica diferencia significativa ($p < 0,05$) respecto a las células control; ns: diferencia no significativa ($p > 0,05$). 78

Figura 36. Evaluación de la caspasa-3 escindida en células CHO-K1 tratadas con BSY02. Las células CHO-K1 fueron incubadas durante 48 h con BSY02 (0,34 $\mu\text{g/ml}$), DOX (50 $\mu\text{g/ml}$; control positivo) o medio DMEM-F12-SFB (células control, sin tratamiento). La cantidad de caspasa-3 escindida se determinó por citometría de flujo. Los resultados se presentan como media $\pm$ desviación estándar del porcentaje de células con caspasa-3 activa respecto a las células control. El símbolo (*) indica diferencias significativas respecto a las células control ($p < 0,05$), ns: diferencia no significativa ($p > 0,05$). 79

Figura 37. Histogramas representativos del análisis del ciclo celular en células CHO-K1 tras 48 h de tratamiento. Se muestran los perfiles de distribución del contenido de ADN correspondientes a células control (sin tratar), tratadas con BSY02 (0,34 $\mu\text{g/ml}$) y con MMC (0,5 $\mu\text{g/ml}$, control positivo). Las regiones sombreadas indican las fases G0/G1 y G2/M del ciclo celular, determinadas según el contenido de ADN medido mediante tinción con ioduro de propidio (IP)..... 80

Figura 38. Porcentaje de células CHO-K1 en las distintas fases del ciclo celular (G0/G1, S y G2/M) luego de 48 h de tratamiento con BSY02 (0,34 $\mu\text{g/ml}$), MMC (0,5 $\mu\text{g/ml}$, control positivo) y células control (medio de cultivo). Los porcentajes de células en cada fase se determinaron por citometría de flujo luego de tinción con ioduro de propidio (IP). Los valores se expresan como media $\pm$ desviación estándar. El símbolo (*) indica diferencia significativa respecto al control ($p < 0,05$), ns: diferencias no significativas ($p > 0,05$). ... 81

Figura 39. Evaluación de la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) en células CHO-K1 mediante citometría de flujo utilizando hidroetidina (HE). Las células fueron tratadas durante 48 h con BSY02 (0,34 $\mu\text{g/ml}$), H_2O_2 (5% v/v, control positivo de estrés oxidativo) y DOX (50 $\mu\text{g/ml}$, control positivo), y comparadas con células control (sin tratar). Los valores se expresan como media $\pm$ desviación estándar. El símbolo (*) indica diferencias significativas con respecto a las células control ($p < 0,05$), ns: diferencia no significativa ($p > 0,05$). 82

Figura 40. Detección de daño en el ADN mediante cuantificación de γH2AX en células CHO-K1. Porcentaje de células CHO-K1 positivas para γH2AX (%) después de 48 h de

tratamiento con BSY02 (0,34 µg/ml) y BLM (100 µg/ml, control positivo) analizado por citometría de flujo. Los valores se expresan como media ± desviación estándar. El símbolo (*) indica diferencias significativas respecto al control ($p < 0,05$), ns: diferencia no significativa ($p > 0,05$).	83
Figura 41. Ensayo de micronúcleos con bloqueo de la citocinesis (CBMN) en células CHO-K1. Imágenes representativas de células binucleadas obtenidas tras 48 h de exposición a los diferentes tratamientos: control, BSY02, mitomicina C (MMC) y bleomicina (BLM). Las preparaciones fueron teñidas con Giemsa al 10% y observadas con un microscopio Zeiss Axioscope 7 con un objetivo de 20X. En los recuadros se muestran ampliaciones donde se destacan células binucleadas con (flechas negras) y sin micronúcleos.	84
Figura 42. Frecuencia de micronúcleos (%MN) en células CHO-K1 tras 48 h de exposición a BSY02, BLM y MMC. Los resultados se expresan como porcentaje de micronúcleos (%MN) en células binucleadas, representados como media ± desviación estándar. El símbolo (*) indica diferencias significativas respecto a las células control ($p < 0,05$); ns: diferencias no significativas ($p > 0,05$).	85
Figura 43. Microfotografías representativas del ensayo cometa en células CHO-K1 tras 48 h de exposición a BSY02, bleomicina (BLM) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Las células fueron teñidas con DAPI observadas mediante microscopía de fluorescencia utilizando el microscopio Zeiss Axio Observer con un objetivo de 20X.	86
Figura 44. Evaluación del daño en el ADN mediante ensayo cometa en células CHO-K1 tras 48 h de tratamiento con BSY02 (0,34 µg/ml), BLM (100 µg/ml) durante 48 h, y H_2O_2 (100 µM) durante 15 min. El porcentaje de ADN en la cola se utilizó como parámetro cuantitativo del daño genotóxico. Los resultados se expresan como media ± desviación estándar. El símbolo (*) indica diferencias significativas en comparación con las células control ($p < 0,05$), ns: diferencia no significativa ($p > 0,05$).	87
Figura 45. Microfotografías representativas de células A549 luego de 48 h de exposición a diferentes concentraciones de BSY02 obtenidas utilizando un microscopio Zeiss Axio Observer con un objetivo de 10X.	88
Figura 46. Evaluación de la viabilidad celular de células A549 tras 48 h de exposición a BSY02, DOX, MMC y BLM mediante el ensayo de MTT. Los datos se expresan como porcentaje de viabilidad celular respecto al control sin tratamiento (100%), representados como la media ± desviación estándar, de al menos tres experimentos independientes. La línea punteada indica el umbral del 70% de viabilidad celular, establecido por ISO 10993-5:2009 como valor de referencia para indicar potencial	

citotóxico. El símbolo (*), (#) y (°), indica diferencia significativa ($p < 0,05$) respecto al control negativo, correspondiendo (*) a DOX, (#) a MMC y (°) a BLM 89

Figura 47. Evaluación del efecto de BSY02 sobre la muerte celular por apoptosis/necrosis en células A549. Las células fueron incubadas durante 48 h con BSY02 (0,34 $\mu\text{g/ml}$) y posteriormente analizadas por citometría de flujo mediante tinción con Anexina V-FITC/PI. Las barras representan los porcentajes de células viables, en apoptosis temprana (Ap. Temprana), en apoptosis tardía (Ap. Tardía) y en necrosis. Las células control se cultivaron en medio DMEM-F12-SFB, mientras que DOX y H_2O_2 se utilizaron como controles positivos de apoptosis. Los valores se expresan como media $\pm$ desviación estándar. El símbolo (*) indica diferencia significativa ($p < 0,05$) respecto a las células control; ns: diferencia no significativa ($p > 0,05$). 90

Figura 48. Evaluación de caspasa-3 escindida en células A549 tratadas con BSY02. Las células A549 fueron incubadas durante 48 h con BSY02 (0,34 $\mu\text{g/ml}$), DOX (50 $\mu\text{g/ml}$; control positivo) o medio DMEM-F12-SFB (células control, sin tratamiento). La cantidad de caspasa-3 escindida se determinó por citometría de flujo. Los resultados se presentan como media $\pm$ desviación estándar del porcentaje de células con caspasa-3 activa respecto a las células control. El símbolo (*) indica diferencias significativas respecto a las células control ($p < 0,05$), ns: diferencia no significativa ($p > 0,05$). 91

Figura 49. Histogramas representativos del análisis del ciclo celular en células A549 tras 48 h de tratamiento. Se muestran los perfiles de distribución del contenido de ADN correspondientes a células control (sin tratar), tratadas con BSY02 (0,34 $\mu\text{g/ml}$) y con MMC (0,5 $\mu\text{g/ml}$, control positivo). Las regiones sombreadas indican las fases G0/G1 y G2/M del ciclo celular, determinadas según el contenido de ADN medido mediante tinción con ioduro de propidio (IP)..... 92

Figura 50. Porcentaje de células A549 en las distintas fases del ciclo celular (G0/G1, S y G2/M) luego de 48 h de tratamiento con BSY02 (0,34 $\mu\text{g/ml}$), MMC (0,05 $\mu\text{g/ml}$, control positivo) y células control (medio de cultivo). Los porcentajes de células en cada fase se determinaron por citometría de flujo luego de la tinción con ioduro de propidio (IP). Los valores se expresan como media $\pm$ desviación estándar. El símbolo (*) indica diferencia significativa respecto al control ($p < 0,05$), ns: diferencias no significativas ($p > 0,05$). ... 93

Figura 51. Evaluación de la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) en células A549 mediante citometría de flujo utilizando hidroetidina (HE). Las células fueron tratadas durante 48 h con BSY02 (0,34 $\mu\text{g/ml}$), H_2O_2 (5% v/v, control positivo de estrés oxidativo) y DOX (50 $\mu\text{g/ml}$, control positivo), y comparadas con células control (sin tratar). Los valores se expresan como media $\pm$ desviación estándar. El símbolo (*) indica

diferencias significativas con respecto a las células control ($p < 0,05$), ns: diferencia no significativa ($p > 0,05$)..... 94

Figura 52. Detección de daño en el ADN mediante cuantificación de la histona γ H2AX en células A549. Porcentaje de células A549 positivas para γ H2AX (%) después de 48 h de tratamiento con BSY02 (0,34 μ g/ml) y BLM (100 μ g/ml, control positivo) analizado por citometría de flujo. Los valores se expresan como media $\pm$ desviación estándar. El símbolo (*) indica diferencias significativas respecto al control ($p < 0,05$), ns: diferencia no significativa ($p > 0,05$)..... 95

Figura 53. Ensayo de micronúcleos con bloqueo de la citocinesis (CBMN) en células A549. Imágenes representativas de células binucleadas obtenidas tras 48 h de exposición a los diferentes tratamientos: control, BSY02 y bleomicina (BLM). Las preparaciones fueron teñidas con Giemsa al 10% y observadas con un microscopio Zeiss Axioscope 7 con un objetivo de 20X. En los recuadros se muestran ampliaciones donde se destacan células binucleadas con (flechas negras) y sin micronúcleos..... 96

Figura 54. Frecuencia de micronúcleos (%MN) en células A549 tras 48 h de exposición a BSY02 y BLM. Los resultados se expresan como porcentaje de micronúcleos (%MN) en células binucleadas, representados como media $\pm$ desviación estándar. El símbolo (*) indica diferencias significativas respecto a las células control ($p < 0,05$); ns: diferencias no significativas ($p > 0,05$). 97

Figura 55. Microfotografías representativas del ensayo cometa en células A549 tras 48 h de exposición a BSY02 y peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Las células fueron teñidas con DAPI observadas mediante microscopía de fluorescencia utilizando el microscopio Zeiss Axio Observer con un objetivo de 20X..... 97

Figura 56. Evaluación del daño en el ADN mediante ensayo cometa en células A549 luego del tratamiento con BSY02 (0,34 μ g/ml) durante 48 h, y H_2O_2 (100 μ M) durante 15 min. El porcentaje de ADN en la cola se utilizó como parámetro cuantitativo del daño genotóxico. Los resultados se expresan como media $\pm$ desviación estándar. El símbolo (*) indica diferencias significativas en comparación con las células control ($p < 0,05$), ns: diferencia no significativa ($p > 0,05$)..... 98

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Principales especies reactivas del oxígeno generados en varios compartimentos celulares, incluyendo la membrana plasmática, el citosol, el retículo endoplásmico y la mitocondria.	26
Tabla 2. Resumen de la metodología aplicada y condiciones de ensayo.	41
Tabla 3. Índice de proliferación celular en presencia de citocalasina B (CBPI) en células CHO-K1 tratadas con U-Omp19, controles positivos (BLM, MMC) y células control....	61
Tabla 4. Porcentaje de viabilidad celular (media $\pm$ desviación estándar) a los diferentes tiempos de exposición y concentraciones de H ₂ O ₂ en la línea celular CHO-K1.....	63
Tabla 5. Índice de proliferación celular en presencia de citocalasina-B (CBPI) en células A549.	72
Tabla 6. Porcentaje de viabilidad celular (media $\pm$ desviación estándar). a los diferentes tiempos de exposición y concentraciones de H ₂ O ₂ en la línea celular A549.	74
Tabla 7. Índice de proliferación celular en presencia de citocalasina B (CBPI) en células CHO-K1 tratadas con BSY02.	84

ABREVIATURAS

ABAC: Asociación Banco Argentino de Células	IC50: Concentración inhibitoria 50
ABPF: Agarosa de Bajo Punto de Fusión	ICH: Consejo Internacional para la Armonización de los Requisitos Técnicos para Productos Farmacéuticos de Uso Humano
APFN: Agarosa de Punto de Fusión Normal	ICCVAM: Comité de Coordinación Interinstitucional para la Validación de Métodos Alternativos
ABS: Absorbancia	I+D: Investigación y Desarrollo
ADN: Ácido desoxirribonucleico	IM: Índice Mitótico
APC: Alofocianina	IP: Ioduro de Propidio
ATCC: del inglés American Type Culture Collection	NAMs: del inglés <i>new approach methods</i>
BLM: Bleomicina	M: Mitosis
BPL: Buenas Prácticas de Laboratorio	MAD: del inglés <i>Mutual Acceptance of Data</i>
BN: Binucleada	MMC: Mitomicina
CaCVAM: Centro Canadiense para la Validación de Métodos Alternativos	MN: Micronúcleo
CBPI: del inglés <i>cytokinesis-block proliferation index</i>	MTT: 3(4,5dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-2H-bromuro tetrazolio
CE: Comisión Europea	OECD: Organización para la Cooperación y Desarrollo
	PCR: Reacción en cadena de la polimerasa
CMC: Centro de Medicina Comparada	PBS: Solución buffer fosfato
CYT-B: Citocalasina-B	POE: Procedimiento Operativo Estandarizado
DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol	ROS: del inglés <i>reactive oxygen species</i>
DMEM-F12: Medio Eagle modificado por Dulbecco y mezcla de nutrientes F-12 de Ham	REACH: Registro, Evaluación, Autorización y Restricción de Sustancias Químicas
DMSO: Dimetilsulfóxido	SFB: Suero Fetal Bovino
DOX: Doxorrubicina	TRIS: Trisaminometano
DSB: del inglés, <i>double strand breaks</i>	TD: tiempo de duplicación
E*: Etidio	UV: Ultravioleta
EC: Ensayo Cometa	
ECVAM: Centro Europeo para la Validación de Métodos Alternativos	
EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético	

EPA: del inglés Environmental Protection
Agency

EPAA: Asociación Europea para Promover de
Métodos Alternativos a la Experimentación
Animal

EPO: Eritropoyetina

FITC: Fluoresceína-5-isotiocianato

GIVIMP: del inglés *Good In Vitro Method
Practices*

γH2AX: Histona 2AX fosforilada

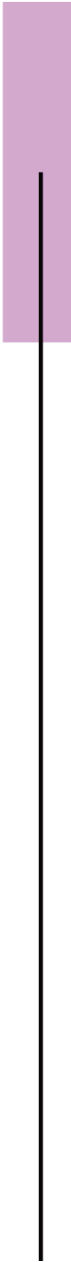
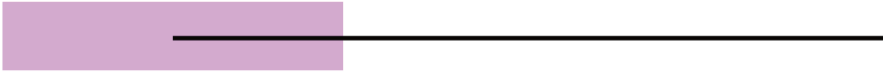
HE: Hidroetidina

RESUMEN

El desarrollo de nuevos fármacos requiere una evaluación preclínica rigurosa que garantice su seguridad antes de la aplicación clínica. En este contexto, los ensayos *in vitro* han adquirido un rol central como métodos alternativos, en concordancia con los principios de las 3R, permitiendo evaluar efectos citotóxicos y genotóxicos de manera ética, reproducible y predictiva. El objetivo de esta Tesis Doctoral fue poner a punto y optimizar una batería de ensayos *in vitro* orientados a la evaluación de citotoxicidad y genotoxicidad de nuevos compuestos en etapa preclínica. Para ello, se evaluaron dos moléculas de interés biomédico: U-Omp19 y BSY02. Los estudios se realizaron en las líneas celulares de mamíferos CHO-K1 (ovario de hámster chino) y A549 (adenocarcinoma pulmonar humano), aplicando biomarcadores de efecto. Se incluyeron ensayos de citotoxicidad tales como viabilidad celular, apoptosis/necrosis, actividad de caspasa-3, análisis del ciclo celular, producción de especies reactivas del oxígeno, detección de histona fosforilada, ensayo de micronúcleos con bloqueo de citocinesis y ensayo cometa. Los resultados obtenidos indicaron que, bajo las condiciones experimentales evaluadas, U-Omp19 y BSY02 no indujeron citotoxicidad ni genotoxicidad significativa en comparación con los valores controles para cada tipo celular evaluado. En contraste, los controles positivos mostraron diferencias significativas respecto a los valores controles, confirmando la sensibilidad y robustez de los ensayos implementados. En conjunto, esta Tesis Doctoral aporta evidencia experimental sólida que respalda la seguridad preclínica de ambos compuestos y consolida una batería de ensayos *in vitro* aplicable a la evaluación genotóxica de nuevos fármacos, contribuyendo al desarrollo de estrategias experimentales más éticas, eficientes y alineadas con los requerimientos regulatorios actuales.

ABSTRACT

The development of new drugs requires rigorous preclinical evaluation to ensure their safety before clinical application. In this context, *in vitro* assays have acquired a central role as alternative methods, in accordance with the 3Rs principles, allowing for the ethical, reproducible, and predictive evaluation of cytotoxic and genotoxic effects. The objective of this doctoral thesis was to refine and optimize a battery of *in vitro* assays for evaluating the cytotoxicity and genotoxicity of new compounds in the preclinical stage. To this end, two molecules of biomedical interest were evaluated: U-Omp19 and BSY02. The studies were performed using the mammalian cell lines CHO-K1 (Chinese hamster ovary) and A549 (human lung adenocarcinoma), applying biomarkers of effect. Cytotoxicity assays were included, such as cell viability, apoptosis/necrosis, caspase-3 activity, cell cycle analysis, reactive oxygen species production, phosphorylated histone detection, micronucleus assay with cytokinesis blockade, and comet assay. The results obtained indicated that, under the evaluated experimental conditions, U-Omp19 and BSY02 did not induce significant cytotoxicity or genotoxicity compared to the control values for each cell type evaluated. In contrast, the positive controls showed significant differences compared to the control values, confirming the sensitivity and robustness of the implemented assays. Overall, this doctoral thesis provides solid experimental evidence supporting the preclinical safety of both compounds and consolidates a battery of *in vitro* assays applicable to the genotoxic evaluation of new drugs, contributing to the development of more ethical and efficient experimental strategies aligned with current regulatory requirements.



1. INTRODUCCIÓN

1.1 INTRODUCCIÓN GENERAL

El desarrollo de nuevos compuestos terapéuticos implica una serie de etapas críticas, desde el descubrimiento hasta la aprobación regulatoria. Estas etapas buscan garantizar la eficacia y seguridad de los productos antes de su administración en seres humanos. Entre ellas, la evaluación preclínica constituye un pilar esencial, ya que permite identificar posibles riesgos toxicológicos mediante ensayos *in vitro* e *in vivo*, en cumplimiento con los requisitos normativos nacionales e internacionales.

No obstante, el empleo de animales de laboratorio en este tipo de estudios plantea un debate sostenido en torno a cuestiones éticas, económicas y científicas. Esto ha impulsado la adopción creciente de estrategias experimentales alternativas basadas en los principios de las 3R: reducción, refinamiento y reemplazo (Russell & Burch, 1959). En este contexto, los métodos *in vitro* han adquirido un rol cada vez más relevante como herramientas valiosas para el estudio de la toxicidad de nuevos fármacos, brindando información precisa de base sobre múltiples parámetros, como la viabilidad celular, el ciclo celular, la inducción de apoptosis, el estrés oxidativo y la integridad del ADN.

En particular, la Toxicología Genética se ha consolidado como una disciplina integrada para identificar compuestos con potencial genotóxico. Esta área se apoya en el uso de biomarcadores de exposición, susceptibilidad y de efecto, y ensayos validados internacionalmente, que permiten discriminar entre efectos mutagénicos, clastogénicos y aneugénicos. La validación y estandarización de estas metodologías son impulsadas por organismos regulatorios nacionales e internacionales, que promueven el desarrollo de una ciencia más ética, reproducible y predictiva. En este contexto, el presente trabajo de Tesis Doctoral tuvo como objetivo desarrollar, optimizar y validar una batería de ensayos *in vitro* orientados a la evaluación de la citotoxicidad y genotoxicidad de nuevos compuestos en etapa preclínica con potencial farmacológico. Para ello, se aplicaron distintos biomarcadores de efecto capaces de detectar si los compuestos en estudio inducen efectos adversos sobre la viabilidad celular, la integridad del ADN o la progresión del ciclo celular.

Esta Tesis Doctoral se centra en la caracterización de los efectos citotóxicos y genotóxicos de dos nuevos compuestos de importancia clínica. Por un lado, se evaluó un adyuvante proteico de nueva generación, U-Omp19, desarrollado por el Instituto de Investigaciones Biotecnológicas (IIB-UNSAM, CONICET). Esta proteína, derivada de la membrana externa de *Brucella abortus*, ha demostrado actividad adyuvante tanto en formulaciones para administración oral como en formulaciones parenterales (por

ejemplo, inyectables) (Darriba et al., 2021). U-Omp19 se encuentra en etapa preclínica de desarrollo y posee dos propiedades fundamentales: la inhibición de enzimas peptídicas gastrointestinales y lisosomales, lo que prolonga la vida media intracelular de los antígenos y la estimulación de células presentadoras de antígeno *in vivo*, favoreciendo la activación de la respuesta inmune adaptativa (Coria et al., 2016).

Por otro lado, se estudió la neuropoyetina denominada actualmente BSY02, una nueva formulación de eritropoyetina con propiedades neuroprotectoras, producida por la empresa Biosynaptica S.A, Santa Fe, Argentina. Esta molécula consiste en una combinación de glicoformas menos ácidas de eritropoyetina (EPO), obtenidas mediante un proceso de purificación alternativo a partir de eritropoyetina humana recombinante (rhEPO) producida en células CHO-K1. A diferencia de la EPO convencional, BSY02 conserva su actividad neuroprotectora, pero presenta una actividad hematopoyética significativamente reducida. Estas características la posicionan como una alternativa terapéutica prometedora para el tratamiento de diversas patologías del sistema nervioso central (Mattio et al., 2011).

1.2 MARCO TEORICO

1.2.1 Fármacos y estudios preclínicos

El paradigma contemporáneo del desarrollo de nuevos fármacos se divide en etapas secuenciales: descubrimiento, evaluación preclínica, ensayos clínicos y aprobación regulatoria (Figura 1).

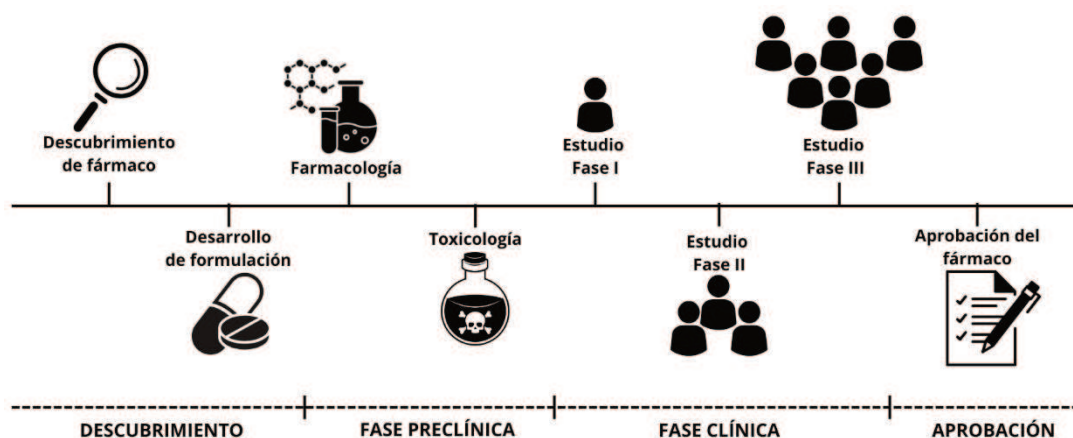


Figura 1. Etapas del proceso de descubrimiento y desarrollo de fármacos. Creada con BioRender (www.biorender.com)

La etapa de descubrimiento se inicia a partir de la identificación del origen biológico de una enfermedad y las posibles dianas terapéuticas. A su vez, esta etapa incluye la identificación de fármacos candidatos, la síntesis, la caracterización, el cribado y la evaluación de su eficacia terapéutica. A continuación, se desarrollan los estudios preclínicos, orientados a la evaluar la seguridad y eficacia del fármaco según lo establecido por las regulaciones internacionales, así como a la caracterización de sus propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas, tanto en sistemas *in vitro* como *in vivo*. Estos estudios deben garantizar que los ensayos se realicen de forma segura y ética, permitiendo que se avance únicamente a etapas posteriores de análisis a aquellos candidatos cuya seguridad y eficacia hayan sido debidamente demostradas (Steinmetz & Spack, 2009; Osakwe, 2016). En términos generales, los ensayos preclínicos se dividen en estudios de farmacología general y de toxicología. Los estudios farmacocinéticos son fundamentales para determinar los parámetros de seguridad y eficacia, a partir del análisis de los procesos de absorción, distribución, metabolismo y excreción del fármaco (Osakwe, 2016; Deore et al., 2019). Los estudios toxicológicos, por su parte, pueden realizarse mediante pruebas *in vitro* e *in vivo*, con el objetivo de evaluar los posibles efectos adversos del compuesto. Los estudios *in vitro* permiten

analizar los efectos directos del compuesto sobre la proliferación y el fenotipo celular. Los estudios *in vivo* facilitan la caracterización cualitativa y cuantitativa de los efectos toxicológicos potenciales en organismos completos (Osakwe, 2016; Deore et al., 2019).

Una vez superada esta fase, se llevan a cabo los ensayos clínicos en seres humanos y, finalmente, se solicita la aprobación regulatoria ante las agencias competentes (Steinmetz & Spack, 2009; Osakwe, 2016; Deore et al., 2019; Zurita-Cruz et al., 2019).

Para una evaluación rigurosa de los resultados, las presentaciones ante los organismos de control deben incluir una clara justificación de la elección de los modelos experimentales y de los ensayos realizados, así como una adecuada discusión e interpretación científica de los resultados obtenidos. Es esencial que todos los procedimientos y datos estén debidamente documentados bajo sistemas de calidad verificables, sustentados en Procedimientos Operacionales Estandarizados (POEs) y en las normas de Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL) (Weiskirchen et al., 2023). Estos lineamientos garantizan la trazabilidad de las sustancias en evaluación, de las actividades desarrolladas y de los procedimientos aplicados, asegurando la integridad y confiabilidad de los resultados.

1.2.2 Métodos alternativos

Desde hace años, el uso de animales ha tenido un papel central en el desarrollo de las ciencias biomédicas y en la formulación de normativas con un impacto positivo en la salud humana y animal. Sin embargo, en 1978, David Smyth introdujo el término “método alternativo” para referirse a aquellos procedimientos destinados a sustituir, reducir o refinar el uso de animales de experimentación, con el objetivo de reducir el número de animales necesarios o aliviar el dolor y la angustia asociados a los procedimientos (Gorzalczany & Rodriguez Basso, 2021).

Los métodos alternativos comprenden un conjunto de estrategias orientadas a reducir el número de animales empleados en estudios experimentales, refinar los procedimientos para minimizar el dolor, el estrés o el malestar inducido, y reemplazar el uso de animales por modelos no animales, tales como sistemas *in vitro*, *ex vivo* o *in silico*. Estos enfoques se basan en los principios de las "3R", formulados por Russell y Burch en 1959 (Russell & Burch, 1959): reducción, entendida como la disminución del número de animales necesarios para obtener información confiable con un nivel adecuado de precisión; refinamiento, referido a la implementación de métodos que atenúen o eliminen el sufrimiento animal durante los procedimientos experimentales; y reemplazo, que implica la sustitución del uso de animales vertebrados conscientes por sistemas no sensibles. El marco conceptual de las 3R representa una directriz

fundamental para el diseño racional y ético de estudios experimentales, con el objetivo de minimizar tanto el número de animales utilizados como su sufrimiento, sin comprometer la validez científica ni la calidad de los datos obtenidos (Russell & Burch, 1959). Desde la formulación de estos principios, se han desarrollado numerosos métodos que permiten evaluar los posibles efectos tóxicos de sustancias químicas y productos mediante enfoques que reducen o eliminan el uso de animales. A partir de 1986, el concepto de las 3R fue incorporado a la legislación de la Unión Europea, estableciendo la obligatoriedad de emplear métodos alternativos validados, siempre que estén disponibles, antes de recurrir a los ensayos *in vivo* (Kandárová & Letaáiová, 2011). En consecuencia, la comunidad científica ha intensificado sus esfuerzos por reducir o sustituir las pruebas *in vivo* por ensayos *in vitro* adecuados y éticamente aceptables. Hace tiempo, este compromiso se ha traducido en un notable incremento de estrategias que reducen o prescinden del uso de animales de laboratorio para evaluar la eficacia y/o seguridad de productos destinados al uso humano (Pfuhler et al., 2009; Gorzalczany & Rodriguez Basso, 2021).

En este contexto, ha cobrado especial relevancia el desarrollo y la implementación de los denominados métodos de nuevos enfoques (NAM, del inglés *New Approach Methods*), que incluyen modelos *in vitro* avanzados y herramientas computacionales aplicadas a la toxicología y a la evaluación de seguridad de diversos compuestos. Los NAM presentan varias ventajas: mejoran la capacidad predictiva de la toxicidad de sustancias químicas y la eficacia de fármacos en humanos (Hartung et al., 2024a), lo que contribuye a una mayor protección de la salud humana; responden a un creciente consenso ético y social sobre la necesidad de reducir y, cuando sea posible, sustituir el uso de animales en la investigación (von Aulock et al., 2022); y favorecen la innovación en el desarrollo de fármacos, cosméticos y productos químicos industriales, ya que estas metodologías suelen implementarse con mayor rapidez y menor costo que los protocolos tradicionales basados en la experimentación con animales (Meigs et al., 2018).

1.2.3 Cultivo celular- Líneas celulares

El cultivo celular se desarrolló a principios del siglo XX como una herramienta destinada al estudio del comportamiento de las células animales en un entorno controlado, libre de las variaciones sistémicas propias de un organismo completo durante la homeostasis o bajo condiciones de estrés experimental (Thorpe, 2007; Arango et al., 2013; Hudu et al., 2016). Los cultivos celulares se definen como el proceso de aislamiento de células animales de tejidos sanos o tumorales, su propagación *in vitro* en un medio de cultivo

nutritivo, en condiciones controladas de temperatura, pH, atmósfera gaseosa y humedad, adecuadas para su crecimiento y mantenimiento (Hudu et al., 2016; Santacruz Reyes et al., 2017). Existen diversos tipos de cultivos celulares, como el cultivo primario, en el cual las células se obtienen directamente de tejidos u órganos mediante disgregación mecánica, química o digestión enzimática. Estas células se inducen a crecer en recipientes adecuados de vidrio o plástico, utilizando medios de cultivo complejos. Los cultivos primarios suelen presentar una baja tasa de crecimiento y una población celular heterogénea. Cuando estos cultivos se subcultivan y se mantienen durante períodos prolongados en medios frescos, dan lugar a cultivos secundarios, los cuales presentan mayor durabilidad en comparación con los cultivos primarios, debido a la disponibilidad periódica de nutrientes. A su vez, el cultivo primario, al ser subcultivado, puede originar una línea o cepa celular, que puede ser finita o continua según su capacidad de proliferación en el tiempo (Verma et al., 2020; Weiskirchen et al., 2023).

Las líneas celulares se clasifican, en términos generales, en tres grupos: (1) líneas celulares finitas, (2) líneas celulares continuas, también denominadas inmortalizadas o indefinidas, y (3) líneas de células madre (Pamies et al., 2022; Weiskirchen et al., 2023). Las líneas celulares finitas se derivan generalmente de cultivos primarios y se caracterizan por presentar tasas de crecimiento bajas. En consecuencia, solo pueden cultivarse durante un número limitado de generaciones antes de entrar en senescencia, proceso que se manifiesta mediante la pérdida de la morfología celular característica y la acumulación de lípidos citoplasmáticos. Además, estas células presentan inhibición por contacto y se detienen en las fases G0, G1 o G2 del ciclo celular una vez que forman monocapas (Mao et al., 2012; Weiskirchen et al., 2023). En contraste, las líneas celulares de crecimiento continuo se originan habitualmente a partir de células transformadas o tumorales. Estas células se dividen rápidamente y alcanzan densidades celulares considerablemente mayores en cultivo que las líneas finitas. En algunos casos, pueden presentar aneuploidía (es decir, variaciones en el número de uno o más cromosomas) o heteroploidía (un número cromosómico que no corresponde a un múltiplo simple del número haploide). Asimismo, suelen cultivarse con menores concentraciones de suero, no presentan inhibición por contacto y tienen la capacidad de formar multicapas (Weiskirchen et al., 2023). En todos los casos, el crecimiento de células requiere un entorno artificial pero controlado, en el que a veces se necesitan medios, suplementos y factores de crecimiento altamente especializados para un correcto desarrollo celular.

Un tipo de célula puede crecer de manera adherente (unida a una superficie), lo que requiere un agente que permita desprender de la superficie para el subcultivo, o bien puede flotar libremente en suspensión. Las células adherentes se pueden subdividir en células similares a fibroblastos, que tienen una forma alargada, y células similares a epiteliales, caracterizadas por una forma poligonal (Pamies et al., 2022). Las células no adherentes o en suspensión crecen como células individuales o como cúmulos flotantes en medio líquido que no requieren disociación enzimática (tripsinización) o mecánica durante el subcultivo. Sin embargo, en algunos casos, estas células requieren agitación para un intercambio de gases adecuado y un crecimiento correcto (Weiskirchen et al., 2023).

Las curvas de crecimiento de líneas celulares se utilizan para evaluar las características del crecimiento celular (Figura 2). Luego de un subcultivo, las células atraviesan una fase de latencia (fase *lag*), que puede durar desde unas pocas horas hasta 48 h aproximadamente, dependiendo estrictamente del tipo y origen celular. Durante este periodo, las células adherentes se recuperan del proceso de tripsinización, se adaptan al medio de cultivo, reorganizan su citoesqueleto, y secretan proteínas de la matriz extracelular, lo que facilita su adhesión y propagación sobre el sustrato, por el contrario las células en suspensión atraviesan un período de ajuste metabólico y adaptación al nuevo medio, durante el cual sintetizan las enzimas, coenzimas y macromoléculas necesarias para su funcionamiento y posterior multiplicación. Una vez completados estos procesos, las células ingresan en un nuevo ciclo de crecimiento. Posteriormente, se inicia la fase de crecimiento logarítmica o exponencial, en la que la población celular se duplica a una tasa característica, definida como tiempo de duplicación (TD), propio de cada línea celular. En esta fase se suelen estudiar los efectos de fármacos y agentes químicos que estimulan o inhiben la proliferación celular, efectos inmunomoduladores, antioxidantes, el ciclo celular, la muerte celular, el estrés oxidativo y el daño al ADN, entre otros. Finalmente, a medida que se incrementa la densidad celular y se agotan los nutrientes del medio de cultivo, el cultivo entra en fase estacionaria, donde la tasa de crecimiento disminuye a valores cercanos a cero (Freshney, 2006).

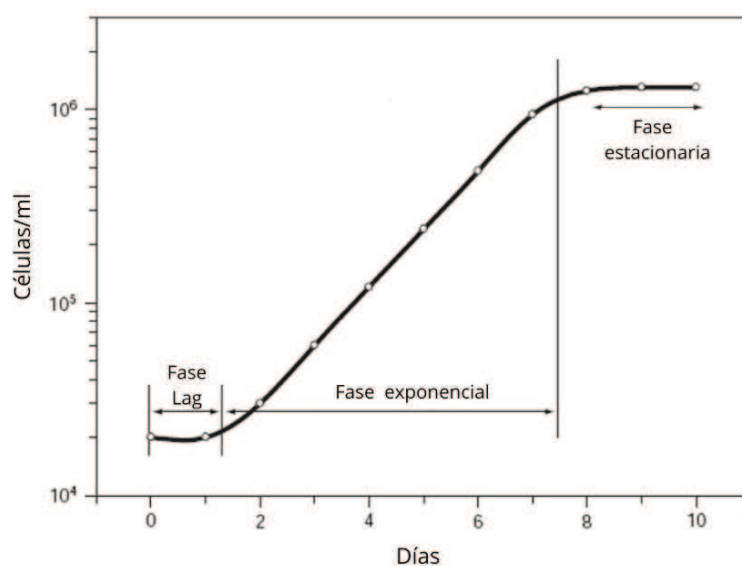


Figura 2. Curva de crecimiento típica de una línea celular *in vitro*, expresada como número de células por mililitro (en escala logarítmica) en función del tiempo (días) transcurridos desde el subcultivo. Se distinguen la fase de latencia (fase lag), la fase exponencial y la fase estacionaria. Adaptado de Freshney, 2006.

La tecnología de cultivo celular ha adquirido gran relevancia en el ámbito de la biología molecular, con aplicaciones tanto en investigación biomédica como en diagnóstico. Los cultivos celulares son herramientas fundamentales en laboratorios bioquímicos, citogenéticos y moleculares, y se emplean para estudiar diversos procesos biológicos, genéticos y toxicológicos asociados a compuestos farmacéuticos y contaminantes ambientales. Además, son utilizadas como métodos alternativos y/o complementarios a la experimentación con animales de laboratorio, permitiendo la realización de ensayos rápidos y directos, con posibilidad de detectar efectos a corto y a largo plazo (Hudu et al., 2016; Phelan & May, 2017). Más allá de su potencial para reemplazar o reducir el uso de animales en estudios toxicológicos, los ensayos *in vitro* ofrecen numerosas ventajas de experimentación respecto de los ensayos *in vivo*.

Entre sus principales ventajas se destacan la consistencia y reproducibilidad de los resultados, así como el alto grado de control sobre el entorno fisicoquímico, incluyendo parámetros como el pH, la temperatura, la presión osmótica, y los niveles de oxígeno y dióxido de carbono (Freshney, 2010; Zhao, 2023). Además, las células pueden ser monitoreadas de forma continua, los costos asociados son relativamente bajos y es posible realizar pruebas rápidas y directas para evaluar la toxicidad de nuevos productos. Estos ensayos requieren cantidades mínimas de sustancia, lo que permite realizar numerosas réplicas y reduce la generación de residuos tóxicos. A su vez, los

sistemas *in vitro* son altamente homogéneos, lo que favorece la reproducibilidad de los resultados entre distintos laboratorios y disminuye la variabilidad asociada a los estudios *in vivo*, como pueden ser las diferencias en la dosificación, el estrés de los animales o las interferencias fisiológicas de órganos no implicados en el experimento (Andrighetti-Fröhner et al., 2006).

No obstante, el cultivo celular también presenta ciertas desventajas. Su implementación requiere personal altamente capacitado y una estricta aplicación de técnicas asépticas, ya que las células animales crecen más lentamente que muchos contaminantes comunes, como bacterias, virus y hongos. Además, los cultivos *in vitro* carecen de las interacciones complejas que se establecen entre distintos tejidos y sistemas dentro de un organismo. Por esta razón, los ensayos *in vitro* no pueden sustituir completamente a la experimentación *in vivo*, ya que no contemplan todas las vías de toxicidad, muchas de las cuales aún no se encuentran completamente caracterizadas. En este sentido, algunas sustancias pueden resultar inocuas en su forma original y volverse tóxicas tras su metabolización (por ejemplo, los promutágenos), mientras que otras pueden ser tóxicas *in vitro*, pero son detoxificadas en el organismo gracias a la acción de las enzimas hepáticas (Segeritz & Vallier, 2017).

1.2.4 Toxicología genética

La Toxicología Genética es una disciplina científica que se sitúa en la intersección entre la genética y la toxicología, que se ocupa de identificar y analizar los efectos de agentes físicos, químicos o biológicos capaces de producir alteraciones en el material genético de los seres vivos. En este sentido, la Toxicología Genética constituye un ámbito de investigación integrador que combina herramientas y enfoques provenientes de diferentes disciplinas, con el propósito de establecer la relación entre la exposición a agentes xenobióticos, que se definen como compuestos extraños que incluyen no solo fármacos, sino también contaminantes ambientales, suplementos dietéticos y aditivos alimentarios, y la aparición de alteraciones genéticas en células somáticas y germinales. (Holmberg, 2001; Monroy et al., 2005; Reyes, 2016). Esta área de estudio abarca el análisis de sustancias capaces de inducir daño al ADN, los mecanismos responsables de dicho daño y las respuestas celulares o tisulares frente al mismo. El daño genético puede identificarse y cuantificarse mediante distintos biomarcadores, tales como la frecuencia de aductos, roturas de cadena, mutaciones y aberraciones cromosómicas (Custer & Sweder, 2008).

Los ensayos de genotoxicidad son desarrollados en diferentes niveles de complejidad, según el sistema experimental utilizado. En términos generales, se reconocen cuatro niveles de evaluación del daño genético, de complejidad creciente, que incluyen tanto estudios *in vitro* como *in vivo* (Mudry & Carballo, 2006):

- Nivel primario (sistemas bacterianos): permite la detección de mutaciones puntuales mediante el uso de sistemas procariotas (bacterias), caracterizados por su simplicidad genética.
- Nivel secundario (cultivo celular): permite la detección de micro y macromutaciones por medio de estudios *in vitro* empleando cultivos celulares en suspensión o en monocapa.
- Nivel terciario (organismo entero): incluye estudios *in vivo* en organismos completos, animales o vegetales, para la detección de micro y macromutaciones utilizando los mismos biomarcadores aplicados en el nivel secundario, bajo condiciones de exposición controlada.
- Nivel cuaternario (epidemiológico): comprende estudios epidemiológicos prospectivos y retrospectivos en poblaciones humanas expuestas de manera ambiental, accidental u ocupacional, utilizando biomarcadores genéticos similares a los niveles anteriores, durante períodos prolongados, que pueden abarcar años o décadas.

La evaluación de la genotoxicidad constituye un componente esencial en la valoración de la seguridad de una amplia gama de sustancias, incluyendo fármacos, productos químicos industriales, pesticidas, biocidas, aditivos alimentarios, cosméticos y medicamentos veterinarios (Niwa & Iwai, 2006; Kirsch-Volders et al., 2011; Smart et al., 2011; Mizuno et al., 2017; Brandão et al., 2020; Guo et al., 2020). Este proceso es especialmente relevante en el marco de las legislaciones internacionales orientadas a la protección de la salud humana y animal (Corvi & Madia, 2017). En el ámbito del descubrimiento y desarrollo de nuevos productos, las pruebas de toxicología genética tienen como propósito principal contribuir a la selección de candidatos seguros, descartando aquellos que presenten riesgo genotóxico significativo. De este modo, se protege a los seres humanos de la exposición a compuestos potencialmente peligrosos y se eliminan tempranamente compuestos mutagénicos, facilitando la predicción de resultados exigidos por los organismos regulatorios y evitando demoras en los procesos de aprobación (Custer & Sweder, 2008; Corvi & Madia, 2017)

La genotoxicidad de las sustancias químicas se evalúa mediante una combinación de ensayos que incluyen tanto pruebas de mutación genética como ensayos citogenéticos.

Estos últimos permiten detectar no solo daño directo al ADN, sino también efectos indirectos a nivel celular, tales como inhibición de la actividad de la topoisomerasa, alteraciones del huso mitótico o citotoxicidad excesiva. Actualmente, existe un consenso internacional sobre la necesidad de aplicar normativas estrictas para controlar el uso de estas sustancias (Nohmi, 2018), ya que los efectos genotóxicos pueden ser irreversibles y conllevar consecuencias biológicas graves (WHO/FAO, 2020a).

Las sustancias genotóxicas pueden afectar la estructura, el contenido de información o la segregación del ADN mediante distintos mecanismos. Aquellas consideradas "reactivas al ADN" producen daño principalmente mediante la formación de aductos covalentes, entrecruzamientos intra o intercatenarios, como enlaces entre ADN-ADN y ADN-proteínas. En cambio, las sustancias "no reactivas al ADN" actúan de forma indirecta, mediante la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) generando daño al ADN (WHO/FAO, 2020a).

En células en división, el daño al ADN, tanto directo como indirecto, puede originar mutaciones si no se repara de manera correcta. Estas mutaciones pueden clasificarse en tres categorías principales: mutaciones genéticas (cambios en bases individuales, pequeñas inserciones o deleciones y reordenamientos intragénicos); aberraciones cromosómicas estructurales (roturas y reordenamientos cromosómicos, también conocidas como clastogenicidad); y aberraciones cromosómicas numéricas (pérdida o ganancia de cromosomas completos, es decir, aneugenicidad) (Zeiger, 2010; More et al., 2021). Dado que las mutaciones también pueden originarse espontáneamente, y su frecuencia varía según el organismo, el tipo de tejido e incluso la región del genoma, resulta necesario considerar el contexto endógeno en el que actúa una sustancia para determinar si incrementa significativamente la tasa mutacional (Menz et al., 2023).

El impacto fenotípico del daño genético depende de múltiples factores, tales como el tipo de mutación, el *locus* afectado, el trasfondo genético, el tipo celular, el tejido involucrado y la etapa del ciclo de vida del organismo. En particular, las mutaciones en células germinales revisten especial relevancia, ya que incluso una única mutación puede transmitirse a la descendencia y perpetuarse en todas las células del nuevo organismo, pudiendo provocar infertilidad, abortos espontáneos o malformaciones congénitas. Por estas razones, la identificación de mutágenos en células germinales constituye una prioridad regulatoria (EFSA Scientific Committee, 2011; OECD, 2016; Menz et al., 2023).

La alta sensibilidad de las técnicas analíticas modernas ha permitido detectar un número cada vez mayor de agentes con capacidad genotóxica, tanto naturales como sintéticos, presentes en concentraciones mínimas en el medio ambiente, en alimentos, en bienes de consumo o en productos farmacéuticos. Aunque los estudios analíticos suelen enfocarse en compuestos y matrices específicas, la evidencia disponible indica que la población general está expuesta de manera constante a múltiples agentes genotóxicos provenientes de diferentes fuentes (Wogan et al., 2004). Por esta razón, el uso deliberado de estas sustancias está sujeto a regulaciones estrictas en distintos sectores productivos y sanitarios (Menz et al., 2023).

1.2.5 Regulación

A lo largo de los últimos años se han intensificado los esfuerzos dirigidos al desarrollo y la evaluación sistemática de modelos más relevantes y robustos que no requieran el uso de animales de experimentación. En este contexto, una iniciativa importante fue anunciada en 2019 por la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (EPA, del inglés *Environmental Protection Agency*), que estableció como objetivo la eliminación progresiva de la realización y financiación de estudios en mamíferos para el año 2035 (Štampar & Žegura, 2024). Este compromiso marcó un hito importante en el camino hacia el desarrollo de ensayos sin animales, promoviendo un enfoque más ético y sostenible en la investigación científica.

El principio de las 3R también se ha incorporado en distintas normativas internacionales. Entre ellas se destaca la Directiva 2010/63/EU, particularmente en sus artículos 4 y 13, que establece la obligación de no realizar ensayos en animales cuando existan métodos alternativos validados y científicamente adecuados. Este principio está igualmente presente en el Reglamento de Cosméticos de la Unión Europea (Reglamento (CE) N° 1223/2009) y en el marco regulatorio REACH (Registro, Evaluación, Autorización y Restricción de Sustancias Químicas), que promueven activamente la reducción y sustitución de la experimentación animal (Bas et al., 2021).

En línea con este enfoque regulatorio, en 2005 se fundó la Asociación Europea para Promover de Métodos Alternativos a la Experimentación Animal (EPAA), una iniciativa de colaboración entre la Comisión Europea (CE), asociaciones comerciales y empresas de diversos sectores industriales, con el objetivo de impulsar el desarrollo y la validación de métodos alternativos al uso de animales de experimentación (Bas et al., 2021; Pistollato et al., 2021).

1.2.5.1 Organismos Reguladores y de Validación de métodos alternativos

Desde 1981, la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OCDE), una organización internacional que agrupa a 37 países miembros, trabaja con el objetivo de promover políticas que mejoren el bienestar económico y social de las personas en todo el mundo. Actualmente, la OCDE es considerada uno de los principales organismos reguladores a nivel internacional, con un rol central en la armonización de políticas en múltiples áreas, que abarcan desde aspectos fiscales y laborales hasta la evaluación de productos químicos y la investigación científica. En este marco, las Directrices de Prueba (TGs, del inglés *Test Guidelines*) de la OCDE establecen métodos estandarizados y reconocidos internacionalmente para la evaluación de los efectos de los productos químicos sobre la salud humana y el medio ambiente. Además, la OCDE ha definido los principios de BPL, los cuales garantizan la Aceptación Mutua de Datos (MAD, del inglés *Mutual Acceptance of Data*) entre los países miembros, evitando la duplicación innecesaria de ensayos y promoviendo el uso racional de recursos (Eskes & Whelan, 2016; Gourmelon 2016). En los últimos años, la OCDE ha reforzado su apoyo a los métodos alternativos mediante la publicación del documento de orientación sobre Buenas Prácticas para Métodos *In Vitro* (GIVIMP, del inglés *Good In Vitro Method Practices*), destinado a guiar el desarrollo, validación e implementación de métodos *in vitro* aplicables en evaluaciones regulatorias de seguridad humana. De manera complementaria, diversas iniciativas impulsadas por otros organismos internacionales han contribuido a promover la implementación de métodos de ensayos *in vitro* y enfoques alternativos (Bas et al., 2021).

Entre estos organismos se destaca la Organización Internacional de Normalización (ISO), una entidad independiente y no gubernamental integrada por miembros de 165 países. Los estándares ISO son elaborados por comités técnicos y subcomités especializados, siguiendo un proceso estructurado que comprende seis etapas: propuesta, preparación, comité, consulta, aprobación y publicación. En el ámbito europeo, la Farmacopea Europea proporciona un listado reconocido legalmente de métodos analíticos y de control de calidad, incluyendo monografías, que contemplan métodos alternativos aceptados para productos medicinales comercializados en dicho continente (Bas et al., 2021).

Por su parte, el Consejo Internacional para la Armonización de Requisitos Técnicos para Productos Farmacéuticos de Uso Humano (ICH, del inglés *International Council for*

Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use), creado en 1990 como un programa trilateral entre Europa, Japón y Estados Unidos, tiene como objetivo reunir a las autoridades reguladoras y a la industria farmacéutica para armonizar los requisitos científicos y técnicos del registro de medicamentos. En este marco, el ICH promueve activamente la reducción del uso de animales de experimentación y la implementación de métodos alternativos siempre que sea científicamente apropiado (Bas et al., 2021).

El proceso de validación y aceptación regulatoria de métodos alternativos se sustenta principalmente en marcos internacionales armonizados, que son adoptados como referencia por las agencias regulatorias de distintos países, incluyendo Argentina. En este contexto, organismos como la OCDE y el Centro Europeo para la Validación de Métodos Alternativos (ECVAM) desempeñan un rol central en la generación de guías y en la validación de metodologías, facilitando su aceptación a nivel global. Estas iniciativas han impulsado el desarrollo y la implementación de métodos alternativos destinados a reemplazar parcial o totalmente el uso de animales en ensayos de seguridad, particularmente en áreas como la genotoxicidad y la evaluación de productos cosméticos. La evaluación del potencial genotóxico constituye un requisito fundamental en el desarrollo de nuevos fármacos (Shah, 2012). En este sentido, los ensayos de genotoxicidad permiten identificar agentes o compuestos (denominados xenobióticos) capaces de interactuar con el ADN y generar daño genético, lo cual puede derivar en diferentes tipos de alteraciones, tales como mutaciones génicas, aberraciones cromosómicas estructurales o numéricas, y eventos de recombinación. Si bien el avance hacia estrategias experimentales más éticas y relevantes desde el punto de vista humano es sostenido, la implementación plena de métodos alternativos en el ámbito regulatorio aún requiere un compromiso continuo, así como recursos adecuados para su validación y adopción a nivel global (Shah, 2012; Bas et al., 2021).

1.2.6 Biomarcadores

Existen diferentes estrategias para el estudio de compuestos genotóxicos, entre las cuales se destaca el empleo de indicadores biológicos o biomarcadores. Estos representan cambios medibles, tanto a nivel celular como a nivel del organismo, que pueden evaluarse en diferentes sistemas biológicos y permiten detectar eventos fisiológicos o patológicos de manera cualitativa y/o cuantitativa. Los biomarcadores son utilizados para identificar exposiciones, evaluar sus consecuencias biológicas, detectar etapas iniciales e intermedias de procesos patológicos, reconocer individuos

susceptibles dentro de una población y fundamentar decisiones de intervención tanto a nivel individual como ambiental (Mudry & Carballo, 2006).

Los biomarcadores se clasifican en tres categorías principales: biomarcadores de exposición, de susceptibilidad y de efecto. Los biomarcadores de exposición se definen como sustancias químicas, sus metabolitos o los productos de la interacción entre una sustancia química y una molécula o célula específica, que puede medirse en el organismo para evaluar el grado de exposición. Por su parte, los biomarcadores de susceptibilidad, reflejan la capacidad intrínseca de un organismo para responder al estrés ambiental, la cual puede verse influenciada por factores genéticos o adquiridos. Por último, los biomarcadores de efecto se definen como alteraciones bioquímicas, fisiológicas, conductuales u otras, medibles en un organismo, que, según su magnitud, pueden asociarse con un estado de salud o con el desarrollo potencial o manifiesto de una enfermedad (Corradi et al., 2015). En particular, los biomarcadores de efecto constituyen verdaderas señales de advertencia temprana, ya que permiten intervenir oportunamente antes de que se produzcan daños irreversibles. Desde una perspectiva metodológica, los biomarcadores de efecto pueden evaluarse mediante diversos enfoques como por ejemplo *in silico*, *in vitro* e *in vivo*, entre otros, cada uno con diferentes niveles de complejidad biológica y capacidad predictiva. Particularmente, los sistemas *in vitro* son modelos experimentales que utilizan células, tejidos u órganos aislados y mantenidos en condiciones controladas de laboratorio para estudiar los efectos de sustancias químicas, contaminantes o fármacos sin necesidad de emplear organismos completos. Estos sistemas permiten evaluar de manera rápida y precisa diversos biomarcadores de efecto, como genotoxicidad, citotoxicidad, estrés oxidativo, apoptosis, alteraciones mitocondriales y cambios en la expresión génica, entre otros. Entre los modelos más utilizados se encuentran los cultivos celulares primarios, las líneas celulares establecidas y no establecidas y los explantes de tejidos, entre otros. Además, son herramientas fundamentales para el cribado toxicológico y el estudio de mecanismos de acción de diversos xenobióticos (Cimino, 2006; Kawata et al., 2009; Kirkland et al., 2011; Kato et al., 2012; Wills et al., 2016; Cartus & Schrenk, 2017).

Las agencias regulatorias internacionales han establecido baterías de bioensayos con el propósito de detectar alteraciones genéticas y caracterizar con mayor precisión y seguridad el daño inducido, evaluando la genotoxicidad potencial de los compuestos tanto *in vitro* como *in vivo*. En este marco, los biomarcadores permiten detectar respuestas biológicas tempranas y resultan especialmente útiles para correlacionar la exposición a mutágenos, teratógenos o carcinógenos con las etapas iniciales del proceso de carcinogénesis. En particular, los biomarcadores de genotoxicidad están

orientados a identificar daño en el material genético o alteraciones cromosómicas. Dentro de los biomarcadores clásicos utilizados en genética toxicológica se destacan el ensayo de micronúcleos, que permite evidenciar daño cromosómico o pérdida de cromosomas; el ensayo cometa, empleado para detectar roturas en la cadena de ADN y otros daños en la doble hélice; y el intercambio de cromátides hermanas, considerado un indicador de inestabilidad cromosómica. Por otro lado, los biomarcadores de citotoxicidad y citoestaticidad permiten evaluar el efecto de un xenobiótico sobre la viabilidad, proliferación y supervivencia celular. Estos incluyen la determinación del índice mitótico como indicador de proliferación, la evaluación de la viabilidad celular asociada al estado metabólico, el análisis de la cinética de proliferación celular y la detección de muerte celular, tanto programada (apoptosis) como no programada (necrosis). Asimismo, pueden considerarse alteraciones a nivel de organelas específicas y del metabolismo celular, que contribuyen a una caracterización integral del daño celular inducido (Cimino, 2006; Kirkland & Beevers, 2006; Kirkland et al., 2011; Kato et al., 2012; Dhawan & Bajpayee, 2013; Cartus & Schrenk, 2017; Dusinska et al., 2019; Smart et al., 2020).

Los ensayos *in vitro* pueden emplearse para determinar biomarcadores de efecto relevantes y, en este sentido, su aplicación puede considerarse una forma de biomonitorio experimental. Si bien el término "ensayo *in vitro*" se utiliza de manera generalizada, es importante reconocer que las células son sistemas biológicos altamente complejos, capaces de regenerarse y reorganizarse dinámicamente. Por lo tanto, ofrecen múltiples criterios de valoración toxicológica, que abarcan desde la evaluación de la integridad de la membrana plasmática hasta procesos más complejos de regulación y señalización celular, como la fosforilación de enzimas específicas asociadas al estrés celular. Los marcadores de necrosis/oncosis, apoptosis, estrés fisiológico y genotoxicidad pueden utilizarse para detectar y cuantificar la respuesta temprana luego de una exposición (Poteser, 2017). Se han desarrollado con éxito distintas metodologías para analizar la genotoxicidad aplicadas al estudio de una amplia variedad de compuestos, tales como nanopartículas, metales pesados, agroquímicos, pesticidas y fármacos (Prósper et al., 2006; Liu et al., 2010; Di Sotto et al., 2014; Dusinska et al., 2019; Evans et al., 2019; Grujičić et al., 2020; Olakkaran et al., 2020).

1.2.6.1 Viabilidad celular

La viabilidad celular se define como el número de células vivas y metabólicamente activas presentes en una muestra. Los ensayos de viabilidad celular son herramientas fundamentales para evaluar la respuesta de las células frente a fármacos, sustancias

químicas u otros agentes potencialmente tóxicos. Un ensayo de viabilidad celular ideal debe ser seguro, rápido, confiable, reproducible y económicamente eficiente, además de no interferir con el compuesto en evaluación ni alterar significativamente el sistema biológico analizado (Aslantürk, 2018; Kamiloglu et al., 2020).

Existen diversos métodos para determinar la cantidad de células viables, basados en técnicas como la citometría de flujo, la microscopía, la fluorimetría y los ensayos colorimétricos, los cuales se basan en distintas funciones celulares, como la actividad enzimática, la integridad de la membrana plasmática, la capacidad de adherencia, la producción de trifosfato de adenosina (ATP), la generación de coenzimas y la captación de nucleótidos (Thangaraj, 2016; Kamiloglu et al., 2020). Entre estos métodos, los ensayos colorimétricos permiten evaluar la actividad metabólica celular mediante la cuantificación de un marcador bioquímico detectable por espectrofotometría (van Meerloo et al, 2011; Kamiloglu et al., 2020).

Uno de los ensayos colorimétricos más utilizados es el ensayo MTT (bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio), desarrollado originalmente por Mosmann (1983) y posteriormente adaptado por Cole (1986) para evaluar la quimiosensibilidad de líneas celulares de cáncer de pulmón humano. Dado que la actividad mitocondrial total se correlaciona directamente con el número de células viables en la mayoría de las poblaciones celulares, este ensayo se emplea ampliamente para estudiar los efectos citotóxicos de fármacos y otros compuestos *in vitro*, tanto en líneas celulares como en cultivos primarios.

El principio del ensayo MTT se basa en la capacidad de las células metabólicamente activas para reducir el MTT a formazán, un producto insoluble de color púrpura, mediante la acción de enzimas deshidrogenasas mitocondrial, a 37 °C (Figura 3). En contraste, las células no viables pierden la capacidad de reducir las sales de tetrazolio. La cantidad de formazán formada se cuantifica espectrofotométricamente, con una absorbancia máxima cercana a los 570 nm, y es directamente proporcional al número de células viables.

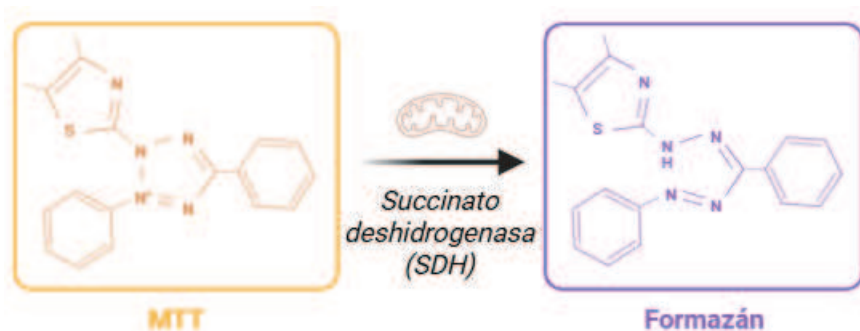


Figura 3. Esquema del principio del ensayo MTT. El compuesto de tetrazolio MTT es reducido por la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa (SDH) presente en células metabólicamente activas, generando formazán, un producto insoluble de color púrpura.

El ensayo MTT resulta especialmente útil para evaluar la sensibilidad de distintas líneas celulares frente a compuestos químicos o fármacos. En células en proliferación, una disminución en el número de células viables indica una inhibición del crecimiento celular. En este sentido, cuanto menor sea el porcentaje de viabilidad, mayor será el potencial citotóxico del compuesto en estudio. De acuerdo con la norma ISO 10993-5 (2009), se considera que un producto presenta citotoxicidad significativa cuando la viabilidad celular se reduce a menos del 70 % en comparación con el control de celular sin tratamiento. La sensibilidad a un fármaco suele expresarse mediante la concentración inhibitoria 50 (CI_{50}), definida como la concentración necesaria para reducir el crecimiento celular en un 50 % respecto al control de células sin tratamiento (van Meerloo et al., 2011).

Existen numerosos antecedentes sobre el empleo de esta metodología para la evaluación de la viabilidad celular (Ferrado et al., 2020; Visentini et al., 2020; Ribas et al., 2021, Ferrado et al., 2023; Ribas et al., 2023; Oggero et al., 2023).

1.2.6.2 Evaluación del ciclo celular

El ciclo celular es un proceso altamente conservado mediante el cual las células eucariotas crecen y se dividen para dar origen a nuevas células hijas (Pucci et al., 2000). Se compone de cuatro fases sucesivas: G1 (gap 1), síntesis (S), G2 (gap 2) y mitosis (M), además de la fase G0, en la que la célula puede permanecer transitoriamente fuera del ciclo proliferativo. El contenido de ADN varía de manera característica según la fase en que se encuentre la célula (Figura 4) (Alberts et al., 2002). En la fase G1 del ciclo en el que se encuentre la célula, posterior a la mitosis, la célula aumenta su tamaño y comienza la síntesis de ARN y proteínas. Durante la fase S se produce la replicación del ADN, para producir una copia exacta del genoma que será transmitido a las células

hijas. En G₂, la célula continúa su crecimiento y sintetiza proteínas adicionales necesarias para la división celular. Tanto la síntesis de ARN como la de proteínas, iniciadas en G₁, continúan durante las fases S y G₂. Finalmente, en la fase M, se produce la condensación cromosómica y la división celular propiamente dicha, lo que da lugar a dos células hijas genéticamente idénticas. Algunas células pueden abandonar transitoriamente el ciclo y entrar en la fase G₀, un estado de reposo reversible que les permite reingresar al ciclo cuando sea necesario (Houtgraaf et al., 2006; Matthews et al., 2022).

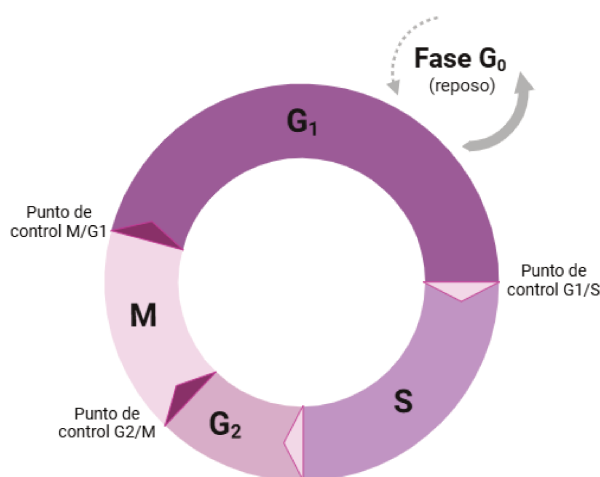


Figura 4. Esquema del ciclo celular y sus puntos de control. El ciclo celular está compuesto por las fases G₁, S, G₂ y M, con puntos de control específicos (G₁/S, G₂/M y M/G₁) que aseguran la correcta progresión y replicación del ADN. Algunas células pueden salir temporalmente del ciclo y entrar en la fase G₀, un estado de reposo reversible. Figura creada con BioRender (www.biorender.com).

El ADN está expuesto de manera constante a diversos tipos de daño, inducidos tanto por agentes ambientales como la radiación ultravioleta (UV), la radiación ionizante y diversas sustancias genotóxicas, como por subproductos del metabolismo celular. Entre estos últimos se incluyen las ROS (ROS, del inglés *Reactive Oxygen Species*), tales como el anión superóxido, el radical hidroxilo y el peróxido de hidrógeno, generados durante la respiración oxidativa y de la peroxidación lipídica. Estos compuestos pueden inducir distintos tipos de daños en el ADN, como roturas de cadena simple o doble, errores durante el emparejamiento de bases, formación de aductos químicos, entre otros tipos de lesiones (Houtgraaf et al., 2006).

Para preservar la estabilidad genómica, las células han desarrollado múltiples vías de reparación del ADN, cada una especializada en un tipo específico de daño. Estas vías

involucran la acción coordinada de proteínas sensoras, transductoras y efectoras que detectan la lesión, amplifican la señal y activan respuestas celulares apropiadas. Cuando la reparación es exitosa, se restablece la integridad del genoma; sin embargo, si el daño persiste o es irreparable, el ciclo celular puede detenerse de manera transitoria o permanente, lo que lleva a la célula a un estado de senescencia o, alternativamente, a la activación de la apoptosis. Ambos mecanismos impiden la proliferación de células dañadas y previenen la propagación de mutaciones a la descendencia celular (Houtgraaf et al., 2006).

El análisis del contenido de ADN y de las alteraciones en la progresión del ciclo celular mediante citometría de flujo es una herramienta ampliamente utilizada para evaluar los efectos de agentes con capacidad genotóxica en distintos tipos celulares. Este enfoque se basa en el uso de colorantes de ADN de unión estequiométrica, cuya fluorescencia es proporcional a la cantidad de ADN presente en cada célula. En condiciones normales, las células diploides en fases G₀ y G₁ presentan un contenido de ADN de 2n. Durante la fase S, la síntesis de ADN incrementa progresivamente ese contenido hasta alcanzar 4n al final de la replicación, manteniéndose así durante las fases G₂ y M. Al concluir la mitosis, se originan dos células hijas con un contenido de ADN nuevamente 2n. La distribución del contenido de ADN a lo largo del ciclo celular permite clasificar las células en tres poblaciones principales: células en G₀/G₁ (2n); S (contenido intermedio) y G₂/M (4n) (Figura 5) (Bihari, 2017; Darzynkiewicz et al., 2017).

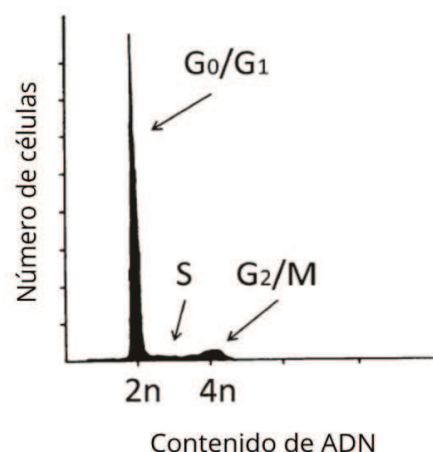


Figura 5. Análisis del ciclo celular mediante citometría de flujo. El gráfico muestra la distribución de una población celular en las distintas fases del ciclo celular según el contenido de ADN. El eje x representa la cantidad relativa de ADN (2n–4n) y el eje y el número de células. Las células en G₀/G₁ presentan un contenido diploide (2n), mientras que aquellas en fase S muestran un aumento progresivo en el contenido de ADN debido a la replicación. Las células en G₂/M poseen un contenido tetraploide (4n), correspondiente a las fases finales del ciclo antes de la división celular (Darzynkiewicz et al., 2017).

1.2.6.3 Muerte celular por apoptosis y necrosis

El proceso apoptótico fue descrito por Kerr y col. (Kerr y col., 1972) como un mecanismo celular programado, activo, dependiente de energía y esencial que involucra eventos bioquímicos y morfológicos característicos. Entre los mismos pueden mencionarse la formación de ampollas en la membrana plasmática, la condensación de la cromatina, la fragmentación del ADN y externalización de la fosfatidilserina (Kerr et al., 1972; Youle & Strasser, 2008; Choudhary et al., 2015a). La apoptosis es un proceso fundamental para mantener la homeostasis tisular, eliminar células dañadas y controlar la proliferación celular en organismos multicelulares (Xu et al., 2019; El-Hefny et al., 2020).

La apoptosis puede activarse a través de dos vías principales: la vía extrínseca, mediada por receptores de muerte celular, y la vía intrínseca, regulada por las mitocondrias (El-Hefny et al., 2020). El proceso de apoptosis puede activarse por diversas señales tanto internas como externas, como el daño en el ADN, el estrés oxidativo, especies reactivas de nitrógeno, choque térmico, privación de nutrientes, las infecciones virales y la hipoxia. Además, la exposición a xenobióticos, como pesticidas, contaminantes ambientales, fármacos quimioterapéuticos, entre otras, también puede inducir apoptosis, generalmente a través de la inducción de estrés oxidativo (Redza-Dutordoir & Averill-Bates, 2016).

Muchos de los cambios asociados a la progresión de la apoptosis pueden evaluarse mediante citometría de flujo (Ormerod, 1998; 2000). La mayoría de los ensayos se basan en la detección de alteraciones en la membrana plasmática o en la degradación extensiva del ADN en las células apoptóticas. Una de las técnicas más empleadas para detectar eventos apoptóticos tempranos es la marcación con Anexina V-FITC en presencia de calcio, que permite identificar la externalización de fosfatidilserina en la membrana plasmática (Figura 6). En este ensayo, la Anexina V se emplea conjugada con el fluorocromo isotiocianato de fluoresceína (FITC), mientras que el yoduro de propidio (IP) se emplea como colorante de exclusión para evaluar la integridad de la membrana plasmática. Esta combinación permite diferenciar células viables (Anexina V-FITC negativas, IP negativas), células en apoptosis temprana (Anexina V-FITC positivas, IP negativas) y células en apoptosis tardía o necrosis (Anexina V-FITC positivas, IP positivas) (Vermes et al., 1995; Riccardi et al., 2006).

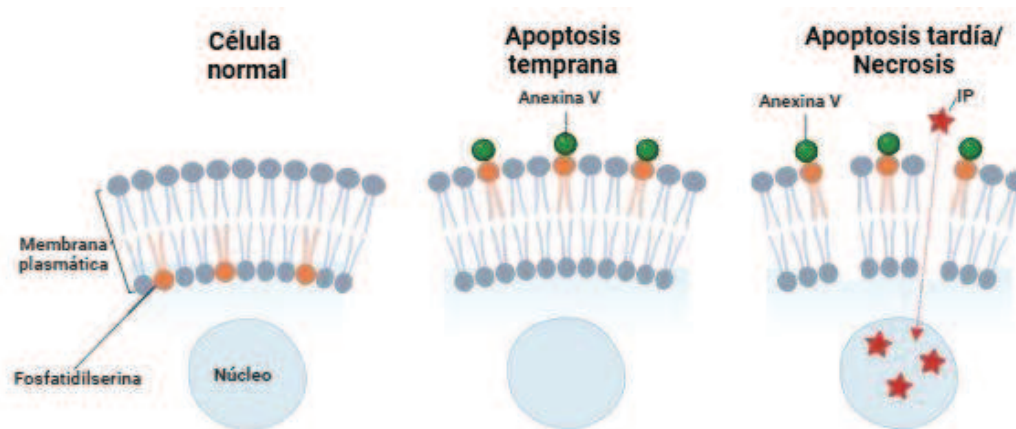


Figura 6. Marcación celular con Anexina V-FITC y ioduro de propidio (IP) para la evaluación de mecanismos de muerte celular. En las células viables, la fosfatidilserina se encuentra en la cara interna de la membrana plasmática (células Anexina-FITC negativas, IP negativas). Durante la apoptosis temprana, la fosfatidilserina se externaliza y puede ser reconocida por la Anexina V-FITC, sin pérdida de la integridad de membrana (células Anexina-FITC positivas, IP negativas). En la apoptosis tardía o necrosis, además de la unión de Anexina V-FITC, el IP penetra en la célula debido al daño de la membrana plasmática, indicando pérdida de viabilidad celular (células Anexina-FITC positivas, IP positivas). Figura creada con BioRender (www.biorender.com)

Existen en la literatura numerosas investigaciones que avalan el estudio de los diversos mecanismos de muerte celular con la finalidad de detectar eventos apoptóticos tanto tempranos como tardíos en sistemas *in vitro* (Ferrado et al., 2020; 2023; Ribas et al., 2021, 2023). Así, podemos mencionar el empleo de este modelo para detectar procesos apoptóticos en células HT-29 (línea celular de cáncer de colon humano) y MDA-MB-231 (línea celular de cáncer de mama humano) luego de la exposición a diferentes bioactivos.

1.2.6.4 Detección de caspasa-3 activa

La apoptosis está estrictamente regulada por una familia de proteasas llamadas caspasas, las cuales se encuentran en las células sanas como precursores inactivos (procaspasas), pero que se activan específicamente durante la apoptosis (Autret & Martin, 2009). Como se mencionó previamente, existen dos vías de inducción de la apoptosis, la extrínseca y la intrínseca, ambas convergentes en la activación de la caspasa-3, un evento crítico y, a menudo, definitorio en la ejecución del proceso de apoptosis (Figura 7) (Fox & Aubert, 2008).

Las caspasas son cisteína-proteasas intracelulares expresadas de manera ubicua que participan tanto en la muerte celular programada como en procesos inflamatorios. Se sintetizan como zimógenos inactivos, los cuales se activan mediante escisión proteolítica para generar enzimas funcionales capaces de activar otras caspasas o de degradar proteínas diana celulares (Kumar & Dorstyn, 2009). Una caspasa activa consta de dos subunidades grandes y dos pequeñas, que forman dos heterodímeros que se asocian formando un tetrámero funcional (Walker et al., 1994). Estas proteasas reconocen secuencias específicas de 4-5 aminoácidos en sus sustratos, con un residuo de ácido aspártico en la posición P4, donde ocurre la escisión proteolítica. En la vía intrínseca, la caspasa-9 activa escinde la procaspasa-3, lo que resulta fundamental para inducir los cambios nucleares y citoplasmáticos característicos de la apoptosis. Las caspasas efectoras, en particular la caspasa-3, degradan o inactivan proteínas cruciales involucradas en el mantenimiento del citoesqueleto, la reparación del ADN, la transducción de señales y el control del ciclo celular (Mazumder et al., 2008; Choudhary et al., 2015a).

La activación secuencial de las caspasas de la familia ICE/CED-3 es un paso esencial en la fase de ejecución de la apoptosis y puede ser desencadenada por diferentes estímulos, entre ellos agentes genotóxicos como la irradiación γ o el tratamiento con fármacos anticancerígenos (Chen et al., 2000; Gong & Almasan, 2000; Mazumder et al., 2008). El uso de inhibidores farmacológicos de la caspasa-3 ha demostrado prevenir la muerte celular inducida por irradiación, lo que resalta su papel central en la apoptosis asociada al estrés genotóxico.

En este contexto, la detección de la caspasa-3 activa se considera un marcador confiable para evaluar la eficacia de tratamientos radioterapéuticos y quimioterapéuticos en diversos tipos de cáncer. Sin embargo, es importante destacar que otros mecanismos de muerte celular inducidos por daño en el ADN también pueden involucrar la activación de la caspasa-3. Aun así, su papel central en la cascada apoptótica la convierte en un indicador clave para determinar si las células están atravesando un proceso apoptótico en respuesta a estímulos proapoptóticos (Fox & Aubert, 2008; Choudhary et al., 2015a).

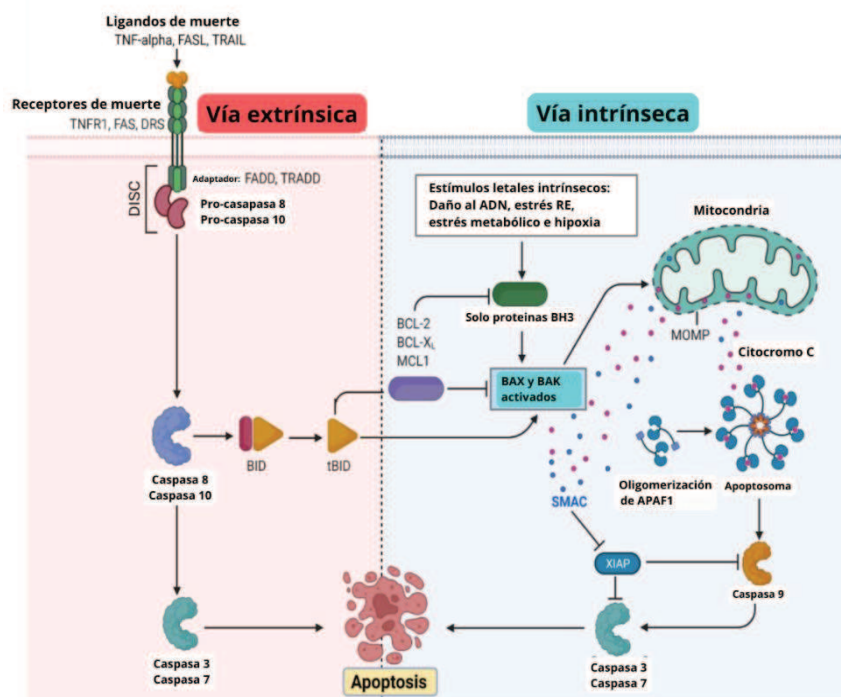


Figura 7. Vías extrínseca e intrínseca de la apoptosis y su convergencia en la activación de caspasas efectoras. En la vía extrínseca, la unión de ligandos de muerte (como TNF- α , FASL o TRAIL) a sus receptores específicos (TNFR1, FAS, DRS) conduce a la formación del complejo DISC y a la activación de las procaspasas-8 y -10. Estas, a su vez, activan a la caspasa-3 y -7, o bien escinden a BID generando tBID, que conecta con la vía intrínseca. En la vía intrínseca, diversos estímulos letales (daño al ADN, estrés del retículo endoplásmico, hipoxia o estrés metabólico) inducen la activación de las proteínas proapoptóticas BAX y BAK, lo que provoca la permeabilización de la membrana mitocondrial externa (MOMP) y la liberación de citocromo c y SMAC. El citocromo c se une a APAF1 formando el apoptosoma, que activa a la caspasa-9, iniciando así la cascada de caspasas efectoras (3 y 7). Ambas vías convergen en la activación de la caspasa-3, evento clave que desencadena los cambios morfológicos y bioquímicos característicos de la apoptosis. Adaptado de Wani et al., 2023.

1.2.6.5 Evaluación de la producción de especies reactivas del oxígeno

Las especies reactivas de oxígeno son moléculas pequeñas, de vida media corta y altamente reactivas (Halliwell, 2011; Winterbourn, 2015). Pueden presentarse como radicales libres derivados del oxígeno, tales como el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) y el radical hidroxilo ($\cdot OH$), o como especies no radicales, como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y los peróxidos orgánicos (Tabla 1). En condiciones fisiológicas, la generación de ROS se encuentra en equilibrio con los sistemas antioxidantes celulares. Estos incluyen sistemas antioxidantes enzimáticos, como superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa y peroxiredoxinas, así como antioxidantes no enzimáticos, entre ellos las vitaminas C y E, el glutatión, el ácido lipoico, los carotenoides y los quelantes de hierro (Halliwell, 2011).

Tabla 1. Principales especies reactivas del oxígeno generados en varios compartimentos celulares, incluyendo la membrana plasmática, el citosol, el retículo endoplásmico y la mitocondria.

Radicales			
Anión superóxido:	$(O_2^{\cdot-})$	Radical alcoxilo:	$RO^{\cdot}$
Radical hidroxilo:	$\cdot OH$	Radical peroxilo:	$ROO^{\cdot}$
No radicales			
Peróxido de hidrógeno	H_2O_2	Ozono	O_3
Oxígeno singlete	1O_2	Peróxidos orgánicos	$ROOH$

Las ROS se producen de forma natural como subproductos del metabolismo aeróbico. Sin embargo, un desequilibrio entre su generación y el sistema de defensa antioxidante conduce a una disfunción y daño celular. En concentraciones bajas o moderadas, las ROS cumplen funciones fisiológicas esenciales, participando en procesos de señalización celular asociados a la proliferación, diferenciación, migración y muerte celular (Covarrubias et al., 2008). En cambio, cuando los sistemas antioxidantes resultan insuficientes para mantener niveles compatibles con la homeostasis, el exceso de ROS provoca estrés oxidativo, definido como un estado en el cual predomina la acción oxidante, provocando daño en biomoléculas como proteínas, ácidos nucleicos, lípidos al igual que en diversas organelas celulares, particularmente las mitocondrias (Halliwell, 2011). La sobreproducción de ROS se asocia con la patogénesis de numerosas enfermedades, como cáncer, diabetes mellitus, aterosclerosis, artrosis, esclerosis lateral amiotrófica y enfermedades neurodegenerativas, como la enfermedad de Parkinson y enfermedad de Alzheimer (Brieger et al., 2012; Kehrer & Klotz, 2015; Ghezzi et al., 2017).

La citometría de flujo es una herramienta altamente sensible y ampliamente utilizada para la detección y cuantificación de ROS en las células. En este sentido, la hidroetidina (HE), también conocida como dihidroetidio, es una sonda redox utilizada para la detección específica del anión superóxido intracelular (Cossarizza et al., 2009; Ribas et al., 2023). La HE es oxidada selectivamente por el anión $O_2^{\cdot-}$ para formar etidio (E^+), un compuesto catiónico que se intercala en el ADN, aumentando su fluorescencia (longitudes de excitación: 500-530 nm; emisión: 590-620 nm). La intensidad de fluorescencia del E^+ es proporcional a la producción intracelular total del anión $O_2^{\cdot-}$ (Rothe & Valet, 1990; Bindokas et al., 1996). Dado que el anión $O_2^{\cdot-}$ no puede atravesar fácilmente la membrana celular, la señal fluorescente detectada refleja predominantemente su producción intracelular. Cabe destacar que la oxidación de HE

no es inducida de manera significativa por otras especies reactivas, como el radical $\cdot\text{OH}$, el O_2 singlete, el H_2O_2 , ni las especies reactivas del nitrógeno, lo que confiere a esta sonda un alto grado de especificidad para la detección de $\text{O}_2^{\cdot-}$ (Luo et al., 2002).

1.2.6.6 Detección de histona H2AX fosforilada (γH2AX)

El daño al ADN puede manifestarse de múltiples formas, incluyendo roturas de cadena simple (SSB, del inglés *Single Strand Breaks*), enlaces cruzados entre moléculas de ADN o entre ADN y proteínas, modificaciones covalentes de las bases nitrogenadas, sustituciones de nucleótidos, desplazamientos del marco de lectura y roturas de doble cadena (DSB, del inglés *Double Strand Breaks*). Entre estas lesiones, las DSB son particularmente graves, ya que comprometen simultáneamente ambas cadenas de la doble hélice del ADN. Este tipo de daño puede inducir la muerte celular por apoptosis y, si no se repara o si se repara de forma incorrecta, puede comprometer la integridad genómica y favorecer la aparición de mutaciones con potencial carcinogénico o incluso efectos hereditarios (Jeggo & Löbrich, 2007).

Las histonas son proteínas altamente conservadas que desempeñan un papel esencial no solo en el empaquetamiento del ADN, sino también en la regulación génica y en la reparación del ADN. Existen cinco familias principales de histonas denominadas H1, H2A, H2B, H3 y H4. Dentro de la familia H2A, la histona H2AX se fosforila rápidamente en el aminoácido serina 139 (dando lugar a la forma conocida como γH2AX) en respuesta a la generación de DSB, como fue descrito por primera vez por Rogakou et al. (1998). El metabolismo celular, el estrés oxidativo, el daño genómico y la apoptosis están estrechamente relacionados con la fosforilación de H2AX (Schütz et al., 2021).

Tras el daño en el ADN, las células activan mecanismos destinados a preservar la estabilidad genómica, denominados colectivamente como respuesta al daño del ADN (DDR, del inglés *DNA Damage Response*). Una de las primeras respuestas de la DDR es la fosforilación de γH2AX , que ocurre pocos minutos después de producirse una SSB o DSB, convirtiéndose así en un marcador temprano, sensible y confiable de este tipo de daño en el ADN (Figura 8) (Schütz et al., 2021). La cuantificación del daño al ADN mediante la detección de γH2AX constituye una herramienta central para la evaluación de genotoxicidad de distintos agentes.

Diferentes agresiones genotóxicas, tanto endógenas como exógenas, incluyendo radiación UV, fármacos y productos químicos, pueden inducir DSB y, en consecuencia, la formación de γH2AX . En particular, numerosos agentes antineoplásicos, como los inhibidores de la replicación del ADN, los agentes inductores de entrecruzamientos y los

inhibidores de topoisomerasas, son capaces de inducir este tipo de daño. Por ejemplo, los fármacos que inducen entrecruzamiento entre cadenas, como el cisplatino, promueven la generación de γ H2AX indirectamente, a través de la alquilación del ADN en las horquillas de replicación dañadas. Los inhibidores de la ADN topoisomerasa I, la camptotecina, inducen predominantemente la fosforilación de H2AX en células en fase S, mientras que los inhibidores de la ADN topoisomerasa II, como el etopósido, la doxorubicina y la mitoxantrona, generan γ H2AX en todas las fases del ciclo celular, especialmente durante la fase G1 (Mah et al., 2010; Rahmanian et al., 2021).

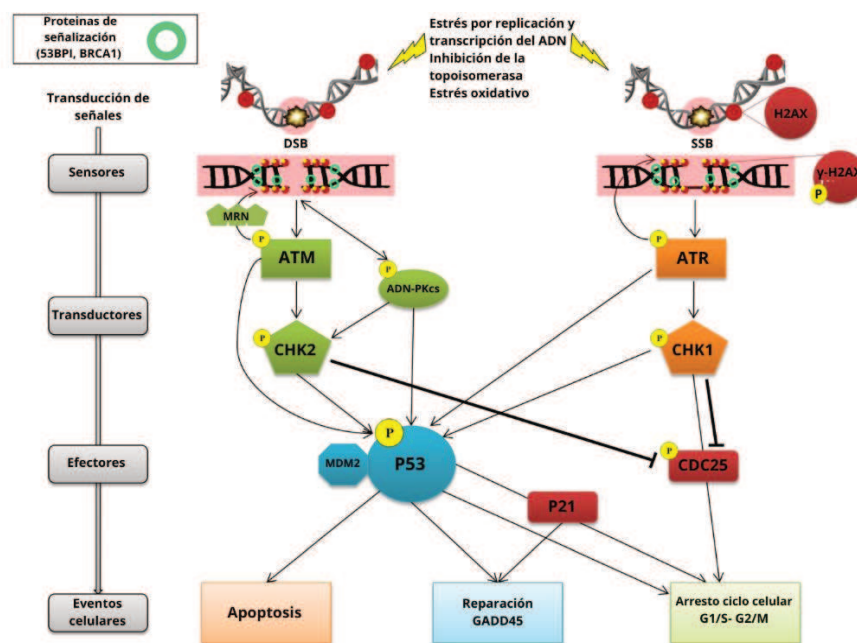


Figura 8. Representación conceptual de la transducción de señales y el papel central de γ H2AX en la respuesta al daño del ADN. El daño en el ADN es detectado de manera rápida por sensores como H2AX, que activan transductores clave, entre ellos ATM, ATR, Chk1 y Chk2. Estas quinasas de punto de control transmiten las señales a moléculas efectoras como p53, p21 y cdc25, que regulan la respuesta celular, determinando si la célula detiene su ciclo, inicia la reparación del ADN o entra en apoptosis. Adaptado de Kopp et al., 2019.

En síntesis, los sitios de γ H2AX son marcadores indirectos ampliamente aceptados para la detección de daño en el ADN inducido por agentes genotóxicos (Mah et al., 2010; Rahmanian et al., 2021). La fosforilación de H2AX y la consecuente formación de γ H2AX representan eventos tempranos y fundamentales de la respuesta celular frente a las DSB, contribuyendo al mantenimiento de la estabilidad genómica. Por lo tanto, la detección de γ H2AX se considera una herramienta útil y confiable para evaluar la genotoxicidad de diversos compuestos. En este contexto, la citometría de flujo es un

método rápido, sensible y reproducible para estimar los niveles de γ H2AX en células cultivadas sometidas a daño genómico, permitiendo cuantificar la fluorescencia de γ H2AX por núcleo en un gran número de células utilizando anticuerpos específicos (Firsanov et al., 2017; Kopp et al., 2019).

1.2.6.7 Evaluación de frecuencia de micronúcleos

El ensayo de micronúcleos (MN) es una de las pruebas de genotoxicidad más utilizadas debido a su robustez, sensibilidad y elevado poder estadístico para detectar daño cromosómico, asociado a eventos clastogénicos y/o aneugénicos, que pueden considerarse eventos distintivos de la mutagenicidad (Frötschl, 2015). Diversos estudios han demostrado que la combinación del ensayo cometa (EC) y el MN constituye una de las baterías de ensayos más adecuadas para evaluar el potencial mutagénico, ya que ambos ensayos son altamente sensibles, de fácil aplicación y complementarios, ya que el EC detecta daño primario en el ADN y el MN evidencia alteraciones cromosómicas (Araldi et al., 2014; OCDE TG489, 2016).

Este ensayo puede llevarse a cabo en diferentes modelos animales, vegetales y en distintos tipos celulares dependiendo del modo de acción del agente a caracterizar y del objeto en estudio (Mudry y Carballo, 2006). Su aplicación es fundamental en toxicología genética para el desarrollo y la evaluación de productos químicos, farmacéuticos y cosméticos de uso humano. (OCDE TG487, 2023).

El ensayo de MN es un indicador indirecto de daño cromosómico que se origina durante la división celular, tanto por fragmentos acéntricos (evento clastogénico) o cromátidas enteras o cromosomas rezagados (evento aneugénico) que no han sido incorporados en los núcleos hijos al momento de la citocinesis y que requieren de una división celular para expresarse (OCDE TG487, 2023). En sistemas *in vitro* o *ex vivo*, la cuantificación se realiza en células binucleadas (BN) mediante el uso de citocalasina B (Cyt-B), un inhibidor del ensamblaje del anillo contráctil de microfilamentos necesario para completar la citocinesis. Este enfoque forma parte del ensayo de micronúcleos con bloqueo de la citocinesis, también conocido como ensayo del citoma (Fenech, 2007). El uso de Cyt-B permite asociar a los MN a células que han atravesado una división celular durante el cultivo, minimizando factores de confusión derivados de alteraciones en la cinética de división o retrasos del ciclo celular. Además, permite distinguir entre células mononucleadas, binucleadas (BN) y polinucleadas, lo que facilita la evaluación simultánea de la citotoxicidad (Fenech, 2007; OCDE TG487, 2023). El ensayo de MN también puede realizarse en ausencia de Cyt-B, lo que simplifica y acelera el

procedimiento. Sin embargo, se ha demostrado que ciertos compuestos con baja inducción de MN, pero con fuerte efecto citostático, pueden generar falsos negativos bajo estas condiciones (OCDE TG487, 2023)

Los MN son estructuras morfológicamente similares a los núcleos principales, aunque más pequeños, y deben cumplir ciertas características para ser considerados válidos. Entre ellas se incluyen (Fenech, 2000; 2007):

- Su diámetro debe representar entre 1/3 y 1/9 del diámetro de uno de los núcleos principales en una célula BN.
- No ser refringentes y, por lo tanto, se pueden distinguir fácilmente de artefactos como las partículas de tinción.
- No están vinculados ni conectados al núcleo principal.
- Pueden estar en contacto con el núcleo principal, pero sin superponerse, con límites claramente definidos.
- Suelen presentar una intensidad de tinción similar, aunque ocasionalmente mayor, a la del núcleo principal.

Diversas revisiones han analizado en detalle los mecanismos mediante los cuales el daño al ADN y la alteración de la maquinaria mitótica pueden inducir la formación de MN y promover alteraciones del material genético (Fenech, 2010; Fenech et al., 2011; Fenech et al., 2016; Ye et al., 2019). Según Fenech (2000), existen seis causas principales del aumento de la frecuencia de MN: (1) defectos genéticos en las proteínas esenciales para la mitosis y sus puntos de control, (2) alteraciones en enzimas involucradas en la reparación del ADN, (3) exposición excesiva a genotoxinas químicas, (4) exposición a radiación ionizante, (5) producción elevada de genotoxinas endógenas generadas por estrés metabólico, y (6) deficiencia de los micronutrientes necesarios como cofactores para la replicación y reparación del ADN. Estas causas coexisten, generando efectos aditivos o sinérgicos que potencian la formación de MN incrementando la inestabilidad genómica (Fenech, 2020).

El ensayo de MN con bloqueo de citocinesis puede ampliarse bajo el enfoque del “ensayo del citoma” (del inglés: *Cytokinesis-Block Micronucleus Cytome assay*), el cual permite una evaluación integral del estado celular mediante la cuantificación simultánea de múltiples biomarcadores de daño genético, proliferación y muerte celular (Fenech, 2007; Fenech, 2020). En este contexto, además de la frecuencia de MN en células binucleadas, se analizan otros indicadores de inestabilidad cromosómica como los

puentes nucleoplásmicos y los brotes nucleares, asociados a eventos de fusión dicéntrica y eliminación de ADN amplificado, respectivamente (Fenech, 2007). Asimismo, el ensayo del citoma incorpora parámetros que permiten evaluar la cinética proliferativa celular, entre ellos el índice de división nuclear, que se calcula en función de la proporción de células mononucleadas, binucleadas y multinucleadas, proporcionando una medida del grado de progresión del ciclo celular y de posibles efectos citostáticos inducidos por los compuestos en estudio (Fenech, 2000; Fenech, 2007). Por otra parte, este enfoque contempla la evaluación de citotoxicidad mediante la identificación morfológica de células en apoptosis y necrosis. Las células apoptóticas se caracterizan por presentar condensación de la cromatina, fragmentación nuclear y formación de cuerpos apoptóticos, mientras que las células necróticas exhiben pérdida de la integridad de la membrana plasmática y desorganización estructural (Fenech, 2007; Thomas et al., 2009). La inclusión de estos parámetros permite discriminar si las variaciones observadas en la frecuencia de micronúcleos se asocian a daño genético directo o a efectos secundarios derivados de citotoxicidad. De este modo, el ensayo del citoma constituye una herramienta robusta que integra información sobre genotoxicidad, citostasis y citotoxicidad, permitiendo una interpretación más completa de los efectos biológicos inducidos por agentes químicos o farmacológicos (Fenech, 2020).

1.2.6.8 Electroforesis en gel de células individuales o ensayo cometa

A diferencia del ensayo de MN, que detecta daño genético fijo a nivel cromosómico tras al menos una división celular, el ensayo cometa (EC) permite evaluar de manera directa y temprana el daño directo en el ADN a nivel de células individuales.

El EC, también conocido como electroforesis en gel de células individuales, fue introducido por Ostling & Johanson (1984) para detectar daño en el ADN inducido por radiación. Desde entonces, se ha convertido en uno de los métodos más utilizados para evaluar la integridad del ADN celular, debido a su alta sensibilidad y versatilidad (Nikoloff et al., 2012; Odetti et al., 2023; Møller et al., 2025). Esta técnica permite detectar roturas de cadena simple o doble, y/o de sitios sensibles al álcali en la molécula de ADN de células eucariotas y posibilita el análisis del daño genotóxico a nivel de células individuales (Møller, 2006; Azqueta & Collins, 2013).

Debido a su simplicidad metodológica, sensibilidad, versatilidad, rapidez y bajo costo, el EC se aplica ampliamente en estudios de genotoxicidad, biomonitoreo humano, epidemiología molecular (Collins, 2004; Cordelli et al., 2021; Ladeira et al., 2024), ecogenotoxicología (Cotelle & Féraud, 1999; Jiang et al., 2023), nutrigenómica (Duthie

& Hawdon, 1998; Cordelli et al., 2021), análisis de los mecanismos de reparación del ADN (Kanaar et al., 1998; Azqueta et al., 2014), evaluación de la genotoxicidad de nanomateriales (Huk et al., 2015; Cardoso et al., 2022; El Yamani et al., 2022) y en la valoración de la integridad genómica de células madre mesenquimales (Fuchs et al., 2012).

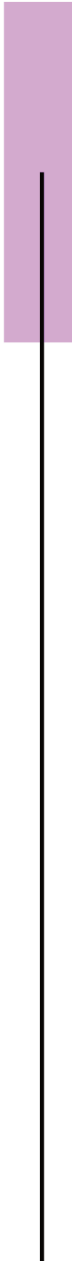
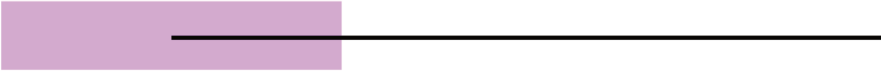
Particularmente, estudios recientes desarrollados por el grupo latinoamericano LA-COMET han demostrado la amplia aplicabilidad del ensayo cometa en biomonitoreo humano, así como en modelos animales y vegetales, incluyendo especies silvestres, destacando su utilidad como biomarcador sensible para la detección temprana de daño en el ADN en distintos contextos ambientales y ocupacionales (Da Silva et al., 2026; Poletta et al., 2026).

El EC puede realizarse en prácticamente cualquier población de células eucariotas *in vivo*, *in vitro* o *ex vivo*, incluyendo tejidos animales, como médula ósea, sangre periférica y órganos sólidos de roedores, así como tejidos vegetales, particularmente las raíces de *Allium cepa* (Navarrete et al., 1997). El principio básico del EC se fundamenta en la migración electroforética de fragmentos de ADN dañados que, debido a su carga negativa, migran a través de un gel de agarosa hacia el ánodo en presencia de un campo eléctrico (Vidya et al., 2015). La imagen obtenida mediante microscopía adopta una morfología similar a la de un cometa, donde la longitud e intensidad de la cola reflejan la frecuencia y magnitud de las roturas en la hebra de ADN, lo que constituye un indicador cuantitativo del grado de genotoxicidad inducido por la sustancia en estudio (Azqueta & Collins, 2013).

El EC puede llevarse a cabo bajo diferentes variantes experimentales, las cuales difieren principalmente en las condiciones de desnaturalización y electroforesis del ADN, determinando así el tipo de lesiones detectadas. La primera versión del ensayo fue desarrollada bajo condiciones neutras por Östling y Johanson (1984), permitiendo la detección principalmente de roturas de doble cadena. Posteriormente, Singh et al. (1988) introdujeron la variante alcalina (pH > 13), la cual incrementó significativamente la sensibilidad del ensayo al posibilitar la detección de un espectro más amplio de daño en el ADN, incluyendo roturas de cadena simple, roturas de doble cadena, sitios lábiles al álcali y lesiones asociadas a procesos de reparación incompletos (Singh et al., 1988; Collins, 2004). En la actualidad, estas dos variantes, neutra y alcalina, constituyen las formas más utilizadas del ensayo. Mientras que la variante neutra se emplea principalmente para la detección de roturas de doble cadena, la variante alcalina permite evaluar daño total en el ADN, siendo considerada la versión estándar en estudios de

genotoxicidad y biomonitorio debido a su mayor sensibilidad (Cordelli et al., 2021; Dunkenberger et al., 2022).

Asimismo, el método admite ciertas modificaciones que permiten detectar distintos tipos de daño genético, como la incorporación de enzimas de reparación o restricción para determinar y cuantificar la presencia de bases oxidadas, estimado como un incremento del daño observado en el ADN, ampliando así la capacidad analítica del ensayo (Collins, 2004; Soloneski et al., 2016).



2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1 HIPÓTESIS

La evaluación preclínica de la seguridad de nuevos compuestos bioactivos requiere abordajes experimentales capaces de detectar de manera temprana y sensible eventos asociados a citotoxicidad y genotoxicidad, dado que el daño celular y genómico constituye un determinante crítico en la aparición de efectos adversos a largo plazo. En este contexto, las estrategias *in vitro* basadas en la integración de múltiples parámetros celulares y moleculares permiten no solo identificar posibles efectos tóxicos, sino también comprender los mecanismos subyacentes que los originan, fortaleciendo la predictividad biológica de los estudios de seguridad. La incorporación de plataformas experimentales multiparamétricas se alinea, además, con las tendencias actuales en toxicología preclínica y con el desarrollo de metodologías alternativas orientadas a una evaluación más eficiente, robusta y ética de nuevos compuestos.

Sobre esta base, en el presente trabajo de Tesis Doctoral se plantea como hipótesis que los ensayos *in vitro* permitirán detectar, con sensibilidad, especificidad y reproducibilidad adecuadas para registros regulatorios, el daño citotóxico y genotóxico inducido por candidatos terapéuticos de reciente investigación tales como el coadyuvante U-Omp19 y la neuropoetina BSY02, en las líneas celulares establecidas CHO-K1 y A549.

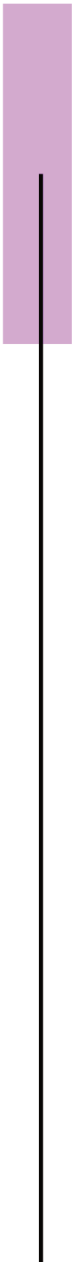
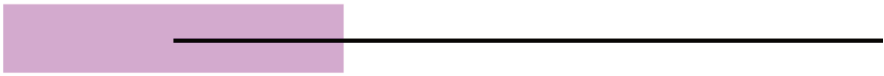
2.2 OBJETIVOS

2.2.1 OBJETIVO GENERAL

Implementar diversos ensayos *in vitro* para determinar la citotoxicidad y genotoxicidad de dos candidatos terapéuticos de reciente investigación tales como el adyuvante U-Omp19 y la neuropoetina BSY02. Estos ensayos preclínicos destinados a registro permitirán consolidar la plataforma tecnológica del CMC.

2.2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Analizar citotoxicidad del co-adyuvante U-Omp19 y de la neuropoetina BSY02 en las líneas celulares CHO-K1 y A549 mediante la evaluación de la viabilidad celular por MTT, detección de apoptosis (Anexina V/PI), activación de caspasa-3, producción de ROS y análisis del ciclo celular mediante citometría de flujo.
2. Analizar el daño genotóxico del co-adyuvante U-Omp19 y de la neuropoetina BSY02 en las líneas celulares CHO-K1 y A549 mediante el análisis de la frecuencia de micronúcleos (MN) y la inducción de rupturas de cadena simple en la molécula de ADN mediante el ensayo cometa (EC).
3. Analizar la inducción de rupturas de doble cadena en la molécula de ADN en las líneas celulares CHO-K1 y A549 mediante la estimación de los niveles de fosforilación de la histona H2AX, específicamente su forma fosforilada γ H2AX, utilizando citometría de flujo.



3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Líneas celulares

El cultivo de las líneas celulares se realizó de acuerdo con los principios de las BPL aplicados a estudios *in vitro* (OCDE N° 14, 2004) y con la GIVIMP (OECD N°286, 2018), así como las recomendaciones de Idowu y Di Silvio. (2013) y Coecke et al. (2005). Se utilizaron líneas celulares certificadas y con trazabilidad garantizada, provistas por ATCC (ATCC: American Type Culture Collection). Una vez recibidas, las líneas celulares fueron conservadas en nitrógeno (N₂) líquido hasta su utilización.

Las líneas celulares empleadas como modelo de estudio fueron:

- ❖ **Línea celular CHO-K1** (ATCC® CCL-61) originada como un subclon de la línea celular parental CHO, derivada de ovario de hámster chino hembra adulta. Esta línea, provista por la ATCC (Rockville, MD, EE.UU.), es ampliamente utilizada como modelo representativo de células normales en estudios de toxicidad y genotoxicidad.
- ❖ **Línea celular A549** (ATCC® CCL-185), derivada de carcinoma de pulmón humano de un paciente masculino de 58 años. Esta línea celular, también provista por la ATCC, se emplea como modelo representativo de células tumorales, particularmente en estudios relacionados con cáncer de pulmón, citotoxicidad y mecanismos de muerte celular.

3.2 Mantenimiento de cultivos celulares

Las células CHO-K1 y A549 se cultivaron en medio de cultivo DMEM-F12 (Gibco, NY, USA) suplementado con 10 % de suero fetal bovino (SFB, Internegocios, Argentina) (DMEM-F12-SFB). Las células fueron mantenidas a 37 °C en una atmósfera al 5% de CO₂. Todos los ensayos fueron realizados usando células en su fase de crecimiento exponencial.

En todas las líneas celulares se constató la ausencia de contaminación con *Mycoplasma* spp. mediante PCR de punto final.

3.3 Compuestos en estudio

En la presente Tesis Doctoral se evaluaron dos compuestos con potencial actividad biológica y relevancia terapéutica, el adyuvante inmunológico U-Omp19 y la neuroepoetina BSY02 (como un derivado de la eritropoyetina humana recombinante con actividad neuroprotectora). Ambos compuestos fueron seleccionados en función de su proyección en el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas y de la necesidad de caracterizar de manera integral su perfil de seguridad a nivel celular y genético.

El estudio se llevó a cabo en el marco de investigaciones preclínicas orientadas a la evaluación de efectos citotóxicos y genotóxicos, aspectos críticos para el desarrollo de candidatos farmacológicos. En este contexto, los ensayos *in vitro* aplicados en esta Tesis Doctoral aportan información relevante para la identificación temprana de posibles riesgos biológicos, contribuyendo a la generación de evidencia científica robusta que sustente su eventual avance en etapas posteriores del desarrollo.

3.3.1 U-Omp19

U-Omp19 es una proteína recombinante derivada de *Brucella abortus*, originalmente identificada como un inhibidor de proteasas de amplio espectro. Diversos estudios han demostrado que esta proteína posee la capacidad de inhibir proteasas lisosomales y extracelulares, lo que le confiere un rol relevante en la modulación de procesos inmunológicos y en la estabilidad antigénica en contextos vacunales (Coria et al., 2019; Darriba et al., 2021).

En particular, U-Omp19 ha sido caracterizada como un adyuvante inmunológico a partir de estudios experimentales que evaluaron su capacidad para modular la respuesta inmune frente a distintos antígenos coadministrados. En modelos experimentales de inmunización, se ha demostrado que su administración conjunta con antígenos incrementa la producción de anticuerpos específicos y potencia la respuesta inmune, evidenciando su capacidad para inducir tanto respuestas humorales como celulares. Asimismo, se ha observado que U-Omp19 favorece la presentación antigénica. Su mecanismo de acción estaría vinculado, al menos en parte, a la inhibición de la degradación proteolítica de los antígenos, lo que prolonga su disponibilidad y facilita una activación más eficiente del sistema inmune adaptativo (Ibañez et al., 2015; Coria et al., 2019; 2022).

Adicionalmente, se ha demostrado que U-Omp19 puede modular el perfil de activación de células presentadoras de antígeno y contribuir a una respuesta inmunitaria balanceada, lo que refuerza su interés como candidato adyuvante en el desarrollo de vacunas de nueva generación y estrategias inmunoterapéuticas innovadoras (Darriba et al., 2021; Darriba et al., 2022). En este contexto, la evaluación de su seguridad y potencial genotóxico resulta un aspecto clave para su eventual aplicación clínica.

3.3.2 BSY02

BSY02 es una glicoforma de la eritropoyetina humana recombinante, caracterizada por presentar una actividad hematopoyética significativamente reducida y una elevada

eficacia neuroprotectora. Esta variante se obtuvo mediante un proceso alternativo de purificación a partir de eritropoyetina recombinante producida en células CHO-K1, lo que da lugar a un perfil estructural diferencial asociado a sus propiedades biológicas particulares (Mattio et al., 2011).

BSY02 ha demostrado efectos neuroprotectores en distintos modelos experimentales, lo que la posiciona como un candidato terapéutico prometedor para el tratamiento de patologías neurológicas, minimizando los efectos adversos asociados a la estimulación eritropoyética clásica. En particular, estos efectos fueron evidenciados en cultivos primarios de neuronas hipocampales, donde promovieron la supervivencia neuronal frente a estímulos apoptóticos, como la inducción con estaurosporina (STP), reduciendo significativamente la proporción de células apoptóticas. Asimismo, en este mismo modelo se observaron efectos sobre la plasticidad neuronal, incluyendo el aumento de la formación de filopodios, el crecimiento de neuritas y la formación de sinapsis, procesos clave en la neuroprotección y reparación neuronal (Bürgi et al., 2021). Las diferencias en su patrón de glicosilación se consideran un factor determinante en la disociación entre las actividades hematopoyética y neuroprotectora.

Recientemente, Iturraspe et al. (2025) demostraron que las células HEK-293 representan una plataforma alternativa viable para la producción de BSY02, generando un perfil de glicosilación más simple y potencialmente menos inmunogénico, con una reducción en la complejidad de los glicanos. Este avance resulta particularmente relevante desde el punto de vista biotecnológico y regulatorio, ya que podría mejorar la reproducibilidad, seguridad y aceptabilidad del producto para su eventual uso clínico. En este marco, la caracterización de actividad citotóxica y genotóxica de BSY02 adquiere especial importancia como parte de su evaluación preclínica integral.

En función de las características biológicas y del potencial terapéutico de U-Omp19 y BSY02, se diseñó una estrategia experimental orientada a evaluar su seguridad biológica mediante ensayos *in vitro*, siguiendo las guías internacionales y haciendo énfasis en la citotoxicidad y genotoxicidad en modelos celulares relevantes.

3.4 Diseño experimental general

Se evaluaron los posibles efectos tóxicos de U-Omp19 y BSY02 sobre las líneas celulares CHO-K1 y A549 mediante una batería de ensayos *in vitro* que permitió analizar parámetros relacionados con citotoxicidad, mecanismos de muerte celular, daño al ADN y producción de ROS.

Las células se sembraron en placas de distinto formato (96 o 24 pocillos), utilizando densidades celulares y volúmenes de medio adaptados al tipo de ensayo a realizar. Las concentraciones de los compuestos en estudio, así como los tiempos de exposición, se ajustaron de acuerdo con los requerimientos de cada técnica y se detallan en las secciones metodológicas correspondientes.

En todos los ensayos se incluyeron controles adecuados para garantizar la validez del sistema experimental:

- Control negativo o células control: células cultivadas en medio completo sin tratamiento.
- Control positivo: agentes de referencia específicos, seleccionados para inducir el efecto esperado en cada ensayo y validar la sensibilidad del método.

Un resumen del diseño experimental general y de las condiciones de ensayo se presenta en la Tabla 2.

Tabla 2. Resumen de la metodología aplicada y condiciones de ensayo.

Variable	Descripción
Compuestos evaluados	U-Omp19 y BSY02
Líneas celulares	CHO-K1 y A549
Ensayos realizados	Viabilidad celular (MTT), apoptosis (Anexina V/PI), ciclo celular, caspasa-3 activa, γ H2AX, ROS intracelular (HE), ensayo de micronúcleos con bloqueo de citocinesis (CBMN) y ensayo cometa (EC).
Controles positivos	Doxorrubicina (DOX), Mitomicina C (MMC), Bleomicina (BLM), Peróxido de hidrogeno (H_2O_2) (según ensayo).
Células control	Células cultivadas en medio completo (sin tratamiento)
Duración del tratamiento	48 h (excepto donde se indique lo contrario)
Condiciones de cultivo	Estufa de cultivo celular a 37 °C, 5 % CO_2 y atmósfera humidificada.

3.5 Ensayo de viabilidad celular (MTT)

El ensayo de reducción de MTT se utilizó para evaluar el efecto citotóxico de los compuestos U-Omp19 y BSY02 sobre las líneas celulares CHO-K1 y A549. Las células fueron sembradas en una placa de 96 pocillos en una densidad de 8×10^3 células por pocillo, en un volumen final de 100 μ L de medio DMEM-F12 suplementado con 10 % de suero fetal bovino (SFB) (DMEM-F12-SFB, medio completo), e incubadas durante 24 h en estufa de cultivo (5% de CO₂ a 37°C) para permitir que las células lleguen a su fase de crecimiento exponencial. Posteriormente, las células se expusieron a distintas concentraciones de los compuestos en estudio durante 48 h. En cada experimento se incluyeron controles positivos de citotoxicidad (DOX, MMC y BLM), así como células cultivadas en medio completo sin tratamiento como control de viabilidad. Como control negativo de viabilidad (o control de muerte celular) se utilizó H₂O₂ al 5% v/v (Cicarelli, Argentina). Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

Los cambios morfológicos inducidos por los tratamientos fueron registrados mediante microscopía óptica utilizando un microscopio invertido Zeiss Axio Observer (Zeiss, Alemania).

Finalizado el tiempo de exposición, las células fueron lavadas con PBS 1X (pH 7,0), se retiró el sobrenadante y se añadieron 100 μ l de solución de MTT (0,5mg/ml; Invitrogen) a cada pocillo. Luego de una incubación de 3 h, se descartó el sobrenadante y se agregaron 100 μ l de DMSO (MP Biomedicals) para solubilizar los cristales de formazán producidos por las células metabólicamente activas.

La absorbancia se midió utilizando un lector de microplacas (espectrofotómetro SPECTROstar Clario, BMG LABTECH) a longitudes de onda de 570/655 nm. El porcentaje de viabilidad celular se calculó a partir de la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Viabilidad} = (\text{ABS}_{\text{tratamiento}} / \text{ABS}_{\text{sin tratamiento}}) \times 100$$

donde ABS_{tratamiento} corresponde a la absorbancia de las células tratadas y ABS_{sin tratamiento} a la absorbancia de las células cultivadas en medio completo sin tratamiento.

3.5.1 Condiciones experimentales evaluadas por tratamiento y por línea celular

Las condiciones experimentales del ensayo de viabilidad celular (MTT) se definieron en función del compuesto en estudio y de la línea celular empleada. Para cada combinación se evaluó un rango amplio de concentraciones, junto con controles positivos de citotoxicidad específicos, con el fin de validar la sensibilidad del método y permitir la correcta interpretación de los resultados.

3.5.1.1 U-Omp19

3.5.1.1.1 Línea celular CHO-K1:

Las células CHO-K1 fueron expuestas a U-Omp19 en las siguientes concentraciones:

5, 10, 25, 50, 100, 150, 200, 300, 400, 500 µg/ml

Controles positivos de citotoxicidad:

DOX (Caelyx, Janssen, Bélgica): 10, 25, 100, 200, 300 µg/ml

MMC (Microsules, Argentina): 0,5, 1, 10, 25, 100, 200, 300, 400 µg/ml

3.5.1.1.2 Línea celular A549:

Las células A549 fueron tratadas con U-Omp19 a concentraciones de: 10, 25, 50, 100,

150, 200, 300 µg/ml

Controles positivos de citotoxicidad:

DOX (Caelyx): 1, 5, 10, 25, 100, 200 µg/ml

MMC (Microsules): 0,5, 1, 10, 25, 50, 100, 200, 300 µg/ml

BLM (Teva, Argentina): 0,25, 0,5, 1, 5, 10, 25, 50, 100, 200 µg/ml

3.5.1.2 BSY02

3.5.1.2.1 Línea celular CHO-K1:

Las células CHO-K1 fueron expuestas a BSY02 en el siguiente rango de concentraciones: 0,2, 0,34, 0,5, 0,7, 0,84, 1, 5, 10, 50 µg/ml

Control positivo de citotoxicidad:

DOX (Caelyx): 1, 5, 10, 25, 100, 200, 300 µg/ml

MMC (Microsules): 0,5, 1, 5, 10, 25, 50, 100, 300 µg/ml

3.5.1.2.2 Línea celular A549:

Las células A549 fueron tratadas con BSY02 a concentraciones de: 0,2, 0,34, 0,5, 0,7, 0,84, 1,68, 4,2, 8,4, 16,8, 84 µg/ml

Controles positivos de citotoxicidad:

DOX (Doxopeg, Raffo, Argentina): 0,5, 1, 5, 10, 25, 50, 100, 200 µg/ml

MMC (Microsules): 0,5, 1, 10, 25, 50, 100, 200, 300 µg/ml

BLM (Teva): 0,25, 0,5, 1, 5, 10, 25, 50, 200 µg/ml

En base a los resultados del ensayo de MTT se seleccionaron las concentraciones de 0,34 $\mu\text{g/ml}$ para BSY02 y de 100 $\mu\text{g/ml}$ para U-Omp19 para la realización de los ensayos posteriores. La justificación de esta selección se expresa en resultados.

3.6 Evaluación de los mecanismos de muerte celular: apoptosis y necrosis

Con el objetivo de evaluar si U-Omp19 y BSY02 inducen muerte celular por apoptosis y/o necrosis, se analizó este mecanismo en las líneas celulares CHO-K1 y A549 mediante citometría de flujo. Para ello, las células fueron sembradas a una densidad de 8×10^3 células por pocillo en placas de 96 pocillos (100 $\mu\text{l/pocillo}$) e incubadas durante 24 h en estufa de cultivo celular bajo condiciones estándar. Posteriormente, las células se expusieron a BSY02 a una concentración de 0,34 $\mu\text{g/ml}$ o U-Omp19 a una concentración de 100 $\mu\text{g/ml}$ durante 48 h. Como controles positivos de citotoxicidad se utilizaron DOX 50 $\mu\text{g/ml}$ y H_2O_2 al 5% (v/v). Las células control (células sin tratamiento) fueron cultivadas en DMEM-F12-SFB. Tras la exposición, las monocapas celulares fueron disgregadas mediante tratamiento con tripsina-EDTA (Gibco; 25 $\mu\text{l/pocillo}$), y la reacción enzimática fue detenida agregando DMEM-F12-SFB. Las suspensiones celulares se centrifugaron a 800 $\times g$, 5 min a 4°C. Posteriormente, las células fueron teñidas utilizando el kit de detección de apoptosis FITC-Annexin V (BD Pharmingen™, Biosciences), siguiendo las instrucciones del fabricante. Finalmente, las células fueron analizadas mediante citometría de flujo, en un citómetro Attune NxT (Life Technology), adquiriéndose un total de 10.000 células por muestra. Los datos obtenidos fueron procesados con el software FlowJo V10.5.0 (BD, Biosciences), determinándose el porcentaje (%) de células viables, células en apoptosis temprana, apoptosis tardía y necrosis.

3.7 Detección de caspasa-3 escindida

La detección de caspasa-3 escindida se realizó mediante tinción con el kit FITC-DEVD-FMK (Abcam, USA). Las células CHO-K1 y A549 fueron sembradas a una densidad de 9×10^4 células por pocillo en placas de 24 pocillos (0,5 ml/pocillo) e incubadas durante 24 h en estufa de cultivo (37°C, 5% de CO_2 , atmósfera húmeda). Luego, las células fueron expuestas a BSY02 (0,34 $\mu\text{g/ml}$) o U-Omp19 (100 $\mu\text{g/ml}$) durante 48 h. Como control positivo de apoptosis se utilizó DOX (50 $\mu\text{g/ml}$). Las células control negativo fueron mantenidas en DMEM-F12-SFB. Todas las condiciones fueron evaluadas por triplicado.

Tras el tratamiento, las monocapas de células fueron disgregadas mediante incubación con tripsina-EDTA (100 $\mu\text{l/pocillo}$), siguiendo el procedimiento descrito previamente, Las

suspensiones celulares se centrifugaron a 800 $\times g$, durante 6 min a 4°C. El pellet se resuspendió en 300 μ l de DMEM-F12-SFB.

A cada muestra se le adicionaron 0,25 μ l de FITC-DEVD-FMK (dilución final: 1:2400) y se incubaron durante 45 min a 37°C en estufa de cultivo. Este marcador fluorescente, permeable y no tóxico, se une de manera irreversible a la caspasa-3 activada en células apoptóticas.

Las células se centrifugaron a 800 $\times g$, durante 5 min, se descartó el sobrenadante y el botón celular se lavó con 300 μ l de Wash buffer IV/Wash Buffer. Tras una nueva centrifugación en las mismas condiciones, el botón celular se resuspendió finalmente en 200 μ l del mismo buffer. El análisis se realizó mediante citometría de flujo (Attune NxT), adquiriéndose 30.000 células por muestra. Los datos obtenidos se procesaron con el software FlowJo V10.5.0, y los resultados se expresaron como el porcentaje (%) de células positivas para caspasa-3 activa, como indicador de apoptosis.

3.8 Estudio de la progresión del ciclo celular

Las líneas celulares CHO-K1 y A549 fueron sembradas a una densidad de 9×10^4 células por pocillo en placas de 24 pocillos (0,5ml/pocillo) e incubadas durante 24 h en estufa de cultivo en condiciones estándar. Transcurrido ese periodo, las células fueron tratadas con BSY02 (0,34 μ g/ml) o U-Omp19 (100 μ g/ml) durante 48 h.

Como controles positivos de alteración del ciclo celular se utilizó:

- Para la línea CHO-K1: MMC (0,5 μ g/ml) y DOX (14 μ g/ml)
- Para la línea A549: MMC (0,05 μ g/ml)

Como células control negativo se utilizaron células cultivadas en DMEM-F12-SFB. Todas las condiciones fueron ensayadas por triplicado.

Tras la exposición, las células fueron recolectadas y fijadas con etanol absoluto (Cicarelli, Argentina) durante 24 h a -20°C. Luego, las células se centrifugaron a 800 $\times g$ por 5 min a 4°C y se descartó el sobrenadante. Posteriormente, se realizó un lavado con PBS-BSA 0,2%, seguido de una nueva centrifugación en las mismas condiciones.

Para la tinción, las células se incubaron con una solución de Ioduro de Propidio (IP, 5 μ g/ml; Molecular Probes, Life technologies) y ARNsa (10%; Sigma Aldrich) en PBS 1X (pH=7,0).

El análisis de la distribución de las fases del ciclo celular se llevó a cabo mediante citometría de flujo en un equipo Attune NxT, adquiriendo al menos 30.000 células por muestra. Los datos fueron procesados con el software FlowJo v10.5.0. El modelado de las fases del ciclo celular se realizó mediante el algoritmo Dean-Jett-Fox en la línea

CHO-K1 (BD Biosciences) y el algoritmo Watson Pragmatic para la línea A549 (BD Biosciences), determinándose el porcentaje de células en las fases G₀/G₁, S y G₂/M.

3.9 Estudio de la producción de especies reactivas del oxígeno

Las células CHO-K1 y A549 fueron sembradas a una densidad de 8×10^3 células por pocillo en placas de 96 pocillos (100 µl/pocillo) e incubadas por 24 h en estufa de cultivo (5% de CO₂ a 37°C). Posteriormente, las células fueron expuestas a BSY02 (0,34 µg/ml) o U-Omp19 (100 µg/ml) durante 48 h. Como control positivo de estrés oxidativo se utilizó DOX (50 µg/ml) en ambas líneas celulares. Todas las condiciones experimentales fueron evaluadas por triplicado. Además, se incluyeron células cultivadas en DMEM-F12-SFB (células control negativo) y células tratadas con H₂O₂ al 5% (v/v) durante 3 min (control de oxidación).

Tras la incubación, la detección de ROS se realizó mediante tinción con dihidroetidina (HE; Invitrogen, USA). Las células CHO-K1 fueron incubadas con 100 µl de HE a una concentración final de 0,5 µM, mientras que para las células A549 se empleó una concentración de 0,1 µM. La incubación se realizó durante 30 min en estufa de cultivo (37°C, 5 % CO₂). Finalizada la incubación, la reacción fue detenida mediante la adición de 100 µl de líquido de focalización (Focusing fluid, Attune™, Thermofisher Scientific).

Las células fueron analizadas mediante citometría de flujo en un equipo Attune NxT. Los datos obtenidos fueron procesados con el software FlowJo V 10.5.0, determinándose el porcentaje de células positiva para HE (% células ROS⁺), como indicador de la proporción de células con producción aumentada de anión O₂⁻.

3.10 Determinación de γH2AX como biomarcador de roturas de doble cadena de ADN

El daño en el ADN inducido por U-Omp19 y BSY02 se evaluó mediante la cuantificación de la histona H2AX fosforilada en la serina 139 (γH2AX). Las líneas celulares CHO-K1 y A549 fueron sembradas a una densidad de 9×10^4 células por pocillo en placas de 24 pocillos (0,5 ml/pocillo) e incubadas durante 24 h en estufa de cultivo (5% de CO₂ a 37°C). Luego, las células fueron tratadas con U-Omp19 (100 µg/ml) o BSY02 (0,34 µg/ml) en DMEM-F12-SFB durante 48 h. Como control positivo de daño genotóxico se utilizó BLM (50 µg/ml), mientras que las células control negativo se cultivaron en medio DMEM-F12-SFB.

Después de la incubación, las células adheridas fueron recuperadas mediante tripsinización (100 µl/pocillo). Las suspensiones celulares se centrifugaron a 800 ×g, durante 8 min a 4°C, se descartó el sobrenadante y las células fueron sometidas a

fijación y permeabilización utilizando el kit eBioscience™ Foxp3 Transcription Factor Staining Buffer Set (ThermoFisher Scientific), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Para la fijación, el pellet celular fue resuspendido en 200 µl del buffer de fijación (1:3 de buffer concentrado:diluyente) y se incubó durante 45 min a 0°C protegido de la luz. Luego, las células se centrifugaron nuevamente a 800 ×g durante 5 min a 4 °C. Para bloquear interacciones inespecíficas proteína-proteína, el botón celular se resuspendió en 25 µl de una solución de bloqueo (glicina 0,3M, SFB 10%, PBS 1X) y se incubó durante 20 min en hielo. Luego, se adicionaron 200 µl de buffer de permeabilización 1X (eBioscience™ Foxp3 Transcription Factor Staining Buffer Set) y se centrifugó nuevamente en las mismas condiciones.

La detección de γH2AX se realizó mediante incubación del botón celular con 25 µl de un anticuerpo monoclonal anti-γH2AX (fosfoserina 139) (hecho en ratón, ab26350, Abcam, USA) a una concentración de 1 µg/ml, durante 30 min a 0°C, protegido de la luz. Tras un lavado con buffer de permeabilización, las células se incubaron con 25 µl de un anticuerpo secundario policlonal anti-ratón conjugado con aloficocianina (APC) (ThermoFisher Scientific), a una dilución 1:1200, durante 30 min en las mismas condiciones que el anticuerpo primario. Tras un lavado adicional con buffer de permeabilización, las células fueron finalmente resuspendidas en 150 µl de líquido de focalización (Attune™, Thermo Fisher Scientific) y analizadas mediante citometría de flujo en un equipo Attune NxT, adquiriéndose 30.000 eventos por muestra. Los datos fueron procesados con el software FlowJo v10.5.0, determinándose el porcentaje de células positivas para γH2AX.

3.11 Estudio de la frecuencia de micronúcleos con bloqueo de citocinesis

El ensayo de micronúcleos *in vitro* con bloqueo de citocinesis (CBMN) se llevó a cabo en las líneas celulares CHO-K1 y A549, siguiendo las recomendaciones de la guía OECD/OCDE TG487, (2023) y el protocolo descrito por Fenech, (2007), con modificaciones menores.

Las células fueron sembradas a una densidad de 8×10^3 células por pocillos en placas de 96 pocillos (100 µl/pocillo) e incubadas por 24 h en estufa de cultivo (5% de CO₂ a 37°C). A continuación, las células fueron expuestas a U-Omp19 (100 µg/ml) o BSY02 (0,34 µg/ml) durante 48 h, por triplicado. Se incluyeron controles positivos específicos para cada línea celular:

-CHO-K1: MMC 0,5 µg/ml y BLM 0,5 µg/ml

-A549: BLM 0,5 µg/ml

Las células control negativo fueron cultivadas en medio DMEM-F12-SFB.

Finalizado el tratamiento, el medio de los pocillos fue reemplazado por 100 µl de medio de cultivo conteniendo 3 µg/ml de citocalasina B (Sigma-Aldrich), un agente que inhibe la citocinesis, permitiendo la formación de células binucleadas. Las placas se incubaron durante 16 a 24 h adicionales, para asegurar que las células completaran al menos una división celular.

Las células fueron luego recolectadas mediante tripsinización con tripsina-EDTA (Gibco), transferidas a tubos tipo Eppendorf, y centrifugadas a $800 \times g$ durante 5 min a 4 °C. Tras descartar el sobrenadante, los botones celulares se resuspendieron en 100 µl de PBS 1X.

Para la preparación de los extendidos celulares, las suspensiones celulares fueron colocadas en embudos colectores de citocentrifugación (Cyto-Tek, Sakura) (Figura 9) y centrifugadas durante 5 min a 700 rpm. Los portaobjetos obtenidos se secaron al aire por 10 min y se fijaron con metanol absoluto frío (Cicarelli, Argentina) durante 20 min.

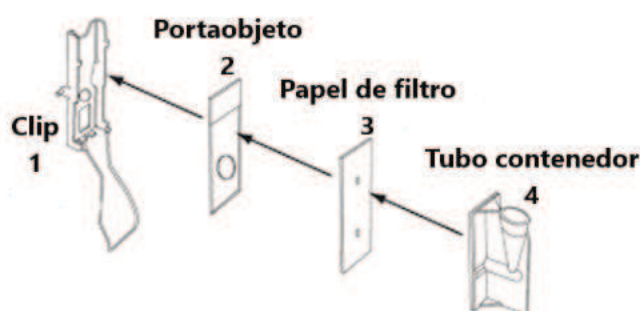


Figura 9. Esquema representativo del armado de conos para la cito-centrifugación. El conjunto se compone de: (1) clip de sujeción, (2) portaobjeto, (3) papel de filtro y (4) tubo contenedor. El montaje permite la correcta recolección y adhesión de las células sobre el portaobjeto durante la cito-centrifugación.

Tinción celular: La visualización de los núcleos celulares se realizó mediante tinción con Giemsa al 10% (Biopack, Argentina) en agua ultrapura. Los portaobjetos se cubrieron con la solución colorante durante 20 min, se lavaron con abundante agua corriente y se dejaron secar al aire. El análisis microscópico se realizó con un microscopio Zeiss Axioscope 7 (Carl Zeiss, Alemania) en un aumento de 200×. Para cada condición experimental se tomaron 10 campos al azar para su posterior análisis y cuantificación.

Cuantificación: El índice de proliferación celular (CBPI) se determinó mediante el recuento manual de las células mononucleadas, binucleadas, trinucleadas y multinucleadas, evaluando un mínimo de 500 células por condición experimental. Un índice de CBPI igual a 1 representa una citostasis completa (100%), por lo tanto, para

considerar válido el ensayo, este valor debía ser superior a 1. El CBPI se determinó mediante la siguiente fórmula:

$$\text{CBPI} = \frac{(\text{n}^\circ \text{ células mononucleadas}) + (2 \times \text{n}^\circ \text{ células binucleadas}) + (3 \times \text{n}^\circ \text{ células multinucleadas})}{\text{n}^\circ \text{ total de células}}$$

Asimismo, se determinó el % de micronúcleos (MN) presentes en 1000 células binucleadas (BN), siguiendo los criterios de puntuación establecidos por Fenech (2007), mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{MN en BN} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de MN en células BN}}{\text{n}^\circ \text{ células BN}} \times 100$$

3.12 Estudio de la inducción de rupturas de cadena simple en el ADN mediante el ensayo cometa alcalino

Previo a la ejecución del ensayo cometa en condiciones alcalinas, se llevó a cabo un ensayo de viabilidad celular (MTT) para determinar la concentración adecuada de H_2O_2 a utilizar como control positivo de daño genotóxico. La concentración seleccionada de H_2O_2 debe generar daño genotóxico sin inducir citotoxicidad significativa (% viabilidad > al 70%).

Para ello, las células CHO-K1 y A549 se sembraron a una densidad de 8×10^3 células por pocillo en placas de 96 pocillos (100 μl /pocillo), e incubadas durante 24 h en estufa de cultivo (5% de CO_2 a 37°C). Posteriormente, las células fueron expuestas a H_2O_2 en concentraciones de 10, 100 y 1000 μM , durante 15-30 min a 4°C , por triplicado. Finalizada la exposición, se descartó el sobrenadante y se adicionaron 100 μl de solución de MTT (0,5 mg/ml). Las placas se incubaron durante 3 h. Luego, se descartó el sobrenadante y se agregaron 100 μl de DMSO (MP Biomedicals) a cada pocillo para disolver los cristales de formazán. La absorbancia se midió a 570/655 nm en un espectrofotómetro (SPECTROstar Clario). El porcentaje de viabilidad celular se calculó utilizando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Viabilidad} = (\text{ABS}_{\text{tratamiento}} / \text{ABS}_{\text{sin tratamiento}}) \times 100$$

donde la $\text{ABS}_{\text{tratamiento}}$ corresponde a la absorbancia de las células tratadas y $\text{ABS}_{\text{sin tratamiento}}$ a la de las células cultivadas en medio completo (células no tratadas, células control).

Ensayo cometa alcalino

Para el EC alcalino, las células CHO-K1 y A549 fueron sembradas a una densidad de 8×10^3 células por pocillo en placas de 96 pocillos (100 µl/pocillo) e incubadas durante 24 h en estufa de cultivo (5% de CO₂ a 37°C). Posteriormente, las células fueron expuestas a U-Omp19 (100 µg/ml) y BSY02 (0,34 µg/ml) durante 48 h, por triplicado. Como controles positivos de daño genotóxico se utilizaron BLM (100 µg/ml, 24 h) (Benítez-Bribiesca & Sánchez-Suárez, 1999; Mira et al., 2013) y H₂O₂ (100 µM, 15 min). Las células utilizadas como control negativo se mantuvieron en DMEM-F12-SFB.

Para la preparación de los portaobjetos, una capa de agarosa de punto de fusión normal (APFN, 1%; Invitrogen) fue extendida sobre los portaobjetos y luego fueron colocados en estufa (37 °C, 30 min) hasta lograr la gelificación de la agarosa. Luego, se preparó agarosa de bajo punto de fusión (ABPF, 1%; Invitrogen) en PBS 1X y se mezclaron 50 µl de la suspensión celular con 150 µl de ABPF. La mezcla se depositó sobre los portaobjetos pretratados en forma de gotas, se cubrió con un cubreobjetos y se dejó solidificar a 4°C durante 10 min. Luego, los cubreobjetos fueron retirados cuidadosamente.

Los portaobjetos fueron sumergidos en buffer de lisis (2,5 M NaCl; 0,1 M EDTA; 10 mM Tris; 1% Tritón X-100; pH 10) y mantenidos a 4°C, en oscuridad, durante 24 h, con el fin de disgregar las membranas celulares y dejar al ADN desprovisto de las mismas (Anderson et al., 1998; Azqueta y Collins, 2013). Luego, los preparados fueron colocados en una cuba de electroforesis horizontal con el buffer de electroforesis (300 mM NaOH, 1 mM EDTA, pH 13) durante 30 min a 2-8°C, para el desenrollamiento de la hebra de ADN. Posteriormente, la electroforesis se realizó a 25 V y 300 mA, durante 30 min, manteniendo la temperatura entre 2-8°C. Bajo el campo electroforético, los segmentos de ADN libres, producto de roturas, migran en dirección al cátodo, originando una cola de cometa (Azqueta y Collins, 2013). Una vez finalizada la electroforesis, los portaobjetos se lavaron 3 veces con buffer neutralizante (0,4 M Tris, pH 7,5; 5 min cada lavado), se fijaron con metanol absoluto durante 20 min y se secaron al aire. Los preparados se conservaron a temperatura ambiente y en oscuridad hasta su análisis.

Para la visualización del ADN, los portaobjetos se rehidrataron con agua ultrapura fría durante 15 min y se tiñeron con DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol; 1 µg/ml, 100 µl/portaobjeto). La observación se realizó mediante microscopía de epifluorescencia utilizando un microscopio Zeiss Axio Observer (Zeiss, Alemania) con un objetivo de 20×. Se obtuvieron imágenes representativas y el daño en el ADN se cuantificó utilizando el software OpenComet, empleando el porcentaje de ADN en la cola como parámetro de

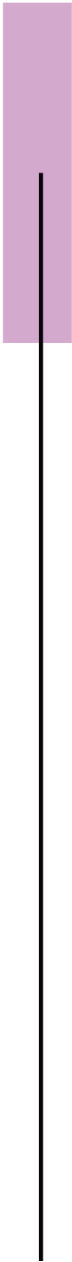
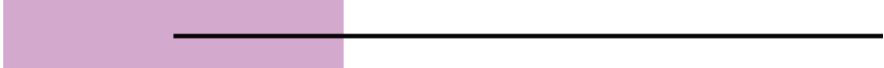
daño genotóxico (Gyori et al., 2014). Para cada condición experimental se analizaron al menos 100 nucleoides por muestra, por triplicado.

3.13 Análisis estadístico

Los datos obtenidos se analizaron utilizando el software estadístico SPSS 22.0 para Windows (SPSS Inc., Chicago, IL, EE. UU.). La normalidad de las distribuciones se evaluó mediante la prueba de Shapiro-Wilk, mientras que la homocedasticidad se evaluó mediante la prueba de Levene.

Para analizar la relación entre la concentración de los compuestos y la viabilidad celular, se realizó un análisis de correlación de Pearson, reportándose el coeficiente de correlación (r) y su correspondiente valor de significancia. Las diferencias entre las distintas concentraciones de cada compuesto se evaluaron mediante un análisis de varianza de una vía (ANOVA), seguido del test post hoc de Dunnett para comparar cada tratamiento con el grupo control negativo. Se consideró un valor de $p < 0,05$ como estadísticamente significativo. Los resultados se expresaron como media $\pm$ desviación estándar (DE).

Las comparaciones entre los distintos grupos experimentales para los parámetros evaluados, muerte celular, actividad de caspasa-3, distribución del ciclo celular, expresión de γ H2AX, frecuencia de micronúcleos, CBPI y daño en el ADN, se realizaron mediante análisis de varianza (ANOVA). Cuando correspondió, se aplicó la prueba de Dunnett, que permite comparar cada grupo tratado con el grupo control (células cultivadas en DMEM-F12-SFB). Las diferencias se consideraron estadísticamente significativos para valores de $p < 0,05$. Los resultados se expresaron como media $\pm$ desviación estándar (DE).



4. RESULTADOS

4.1 ESTUDIO *IN VITRO* DE CITOTOXICIDAD Y GENOTOXICIDAD DEL ADYUVANTE U-Omp19

4.1.a Línea celular CHO-K1

4.1.a.1 Estudio de la viabilidad celular

La capacidad del adyuvante U-Omp19 (5 - 500 µg/ml) para inducir efectos citotóxicos sobre la línea celular CHO-K1 fue evaluada mediante el ensayo de MTT luego de 48 h de exposición. Bajo estas condiciones experimentales, no se observaron alteraciones morfológicas evidentes en las células tratadas, las cuales conservaron el aspecto característico de la línea CHO-K1 en condiciones normales de cultivo (Figura 10).

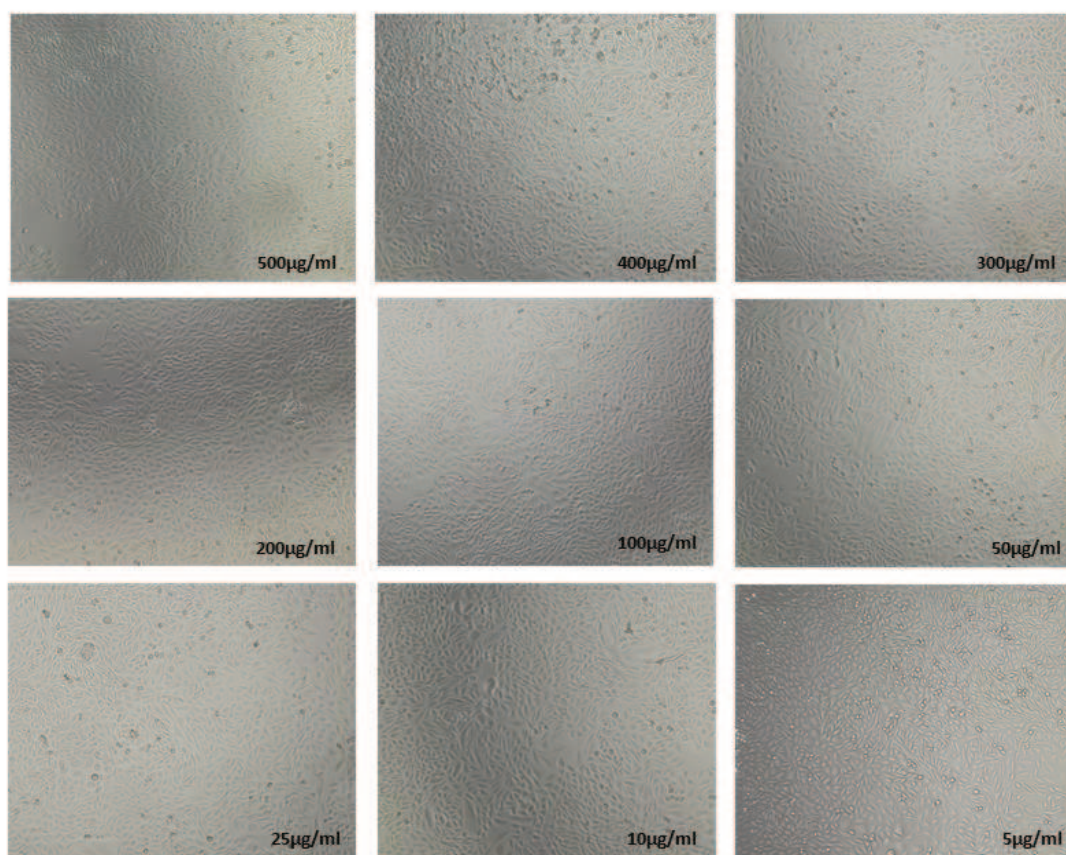


Figura 10. Microfotografías representativas de células CHO-K1 luego de 48 h de exposición a distintas concentraciones de U-Omp19 obtenidas utilizando un microscopio Zeiss Axio Observer con un objetivo de 10X.

En concordancia, la evaluación cuantitativa de la citotoxicidad mediante el ensayo MTT indicó que la exposición a U-Omp19, en el rango de concentraciones evaluado, no produjo efectos citotóxicos sobre las células CHO-K1 luego de 48 h de tratamiento. En todas las condiciones evaluadas, el porcentaje de viabilidad celular se mantuvo por encima del 70%, valor umbral establecido por la norma ISO 10993-5:2009 para considerar un compuesto como no citotóxico. Por el contrario, los controles positivos

DOX (1 - 300 µg/ml) y MMC (0,5 - 300 µg/ml) indujeron una disminución progresiva y dependiente de la concentración en la viabilidad celular (DOX: $r = -0,75$; MMC: $r = -0,7$), confirmando su reconocida actividad citotóxica sobre esta línea celular (Figura 11).

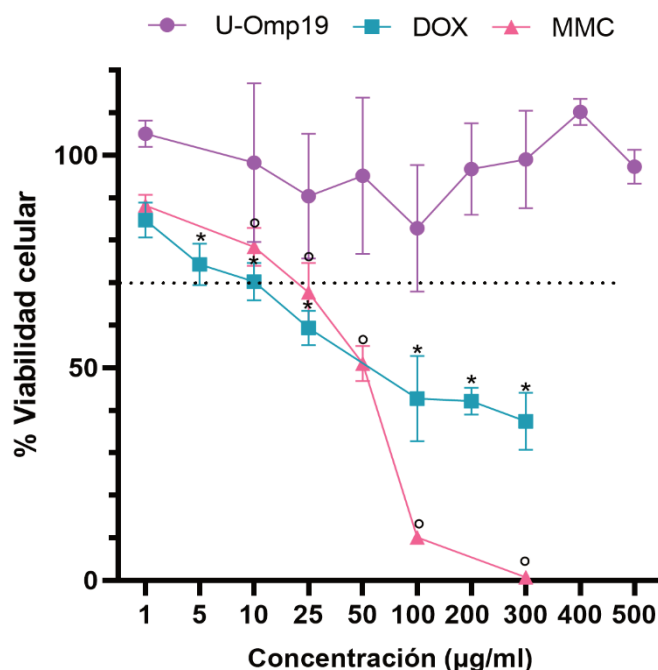


Figura 11. Evaluación de la viabilidad celular de células CHO-K1 tras 48 h de exposición a U-Omp19, DOX y MMC mediante el ensayo MTT. Los datos se expresan como porcentaje de viabilidad celular respecto al control sin tratamiento (100%), representados como la media $\pm$ desviación estándar. La línea punteada indica el umbral del 70% de viabilidad celular, establecido por ISO 10993-5:2009 como valor de referencia para indicar potencial citotóxico. El símbolo (*) y (#) indica diferencia significativa ($p < 0,05$) respecto al control negativo, correspondiendo (*) a DOX, (#) a MMC.

Dado que U-Omp19 no mostró efectos citotóxicos en el rango de concentraciones evaluado, se seleccionó la concentración de 100 µg/ml para los estudios posteriores. Esta concentración, correspondiente al 10% de la presente en la formulación final, permite evaluar efectos funcionales sin comprometer la viabilidad celular. Asimismo, representa una condición de exposición elevada en el modelo *in vitro*, considerando que cada pocillo recibió 10 µg del compuesto, una cantidad relevante en relación con la dosis total utilizada en estudios *in vivo* de seguridad y eficacia. En este contexto, antecedentes experimentales realizados en el CMC y aún no publicados (en ratones BALB/c), en los que U-Omp19 fue administrado de forma segura a una dosis de 100 µg/animal, respaldan la elección de esta concentración como representativa y adecuada para los ensayos realizados.

4.1.a.2 Evaluación de los mecanismos de muerte celular: apoptosis y necrosis

Con el objetivo de evaluar si U-Omp19 induce muerte celular programada, se analizó el perfil apoptótico en las células CHO-K1 mediante citometría de flujo utilizando el kit de doble tinción de detección Anexina V-FITC/IP. Para ello, las células fueron incubadas con U-Omp19 en una concentración de 100 µg/ml durante 48 h.

Este método permitió discriminar cuatro subpoblaciones celulares: células viables (Anexina V⁻/IP⁻), células en apoptosis temprana (Anexina V⁺/IP⁻), células en apoptosis tardía (Anexina V⁺/IP⁺) y células necróticas (Anexina V⁻/IP⁺). Como se muestra en la Figura 12, las células control, cultivadas en medio DMEM-F12-SFB sin tratamiento, presentaron un alto porcentaje de células viables (~90%), con un bajo porcentaje de células apoptóticas (<10%) y necróticas (~2%), lo cual refleja un nivel basal reducido de muerte celular bajo condiciones fisiológicas de cultivo. El tratamiento con U-Omp19 no indujo cambios significativos en la proporción de células en apoptosis temprana ni tardía respecto a las células control ($p > 0,05$). De manera consistente, el porcentaje de células necróticas tras el tratamiento con U-Omp19 fue similar al observado en las células control ($p > 0,05$). En contraste, los controles positivos, DOX y H₂O₂, generaron un aumento marcado y significativo en el porcentaje de células en apoptosis tardía (~90%) comparado con las células control ($p < 0,05$), confirmando la sensibilidad del ensayo y la validez de los controles experimentales.

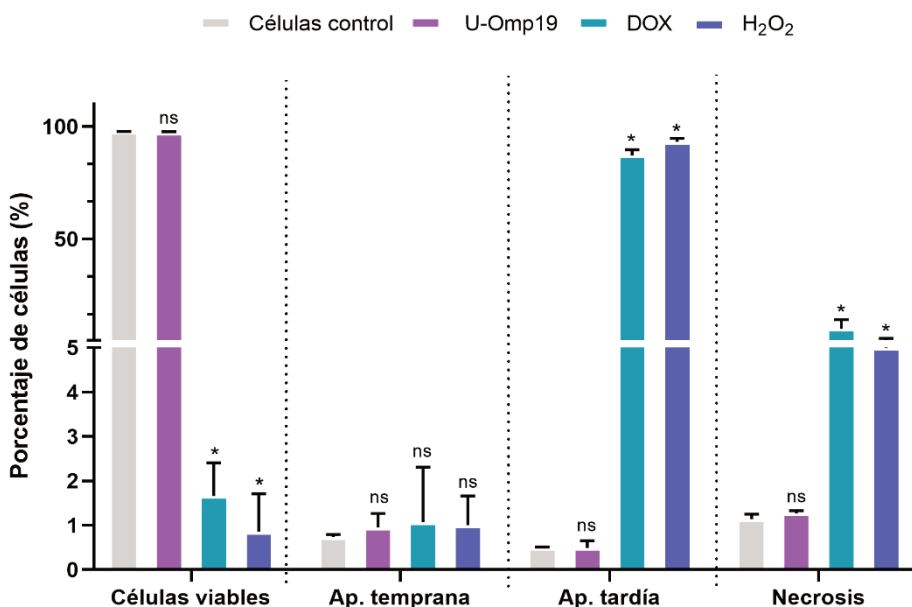


Figura 12. Evaluación del efecto de U-Omp19 sobre la muerte celular por apoptosis/necrosis en células CHO-K1. Las células fueron incubadas durante 48 h con U-Omp19 (100 µg/ml) y posteriormente analizadas por citometría de flujo mediante tinción con Anexina V-FITC/PI. Las barras representan los porcentajes de células viables, en apoptosis temprana (Ap. Temprana), en apoptosis tardía (Ap. Tardía) y en necrosis. Las células control se cultivaron en medio DMEM-F12-SFB, mientras que DOX y H₂O₂ se utilizaron como controles positivos de apoptosis. Los

valores se expresan como media $\pm$ desviación estándar. El símbolo (*) indica diferencia significativa ($p < 0,05$) respecto a las células control; ns: diferencia no significativa ($p > 0,05$).

4.1.a.3 Estudio de la caspasa-3 escindida

Como complemento al análisis de apoptosis, se evaluó la activación de la caspasa-3 escindida. Las células CHO-K1 fueron tratadas durante 48 h con U-Omp19 (100 μ g/ml) y los resultados se compararon con células control (células cultivadas en medio DMEM-F12-SFB, sin tratamiento) y células tratadas con DOX (50 μ g/ml), utilizada como control positivo.

El análisis de la citometría de flujo mostró que el tratamiento con U-Omp19 no indujo un aumento significativo en el porcentaje de células con caspasa-3 activa en comparación con las células control ($p > 0,05$), lo que sugiere que U-Omp19 no activa la vía apoptótica dependiente de caspasa-3 en la línea celular CHO-K1. En contraste, las células tratadas con DOX presentaron un incremento significativo en la activación de caspasa-3 en comparación con las células control ($p < 0,05$), confirmando el efecto pro-apoptótico esperado (Figura 13).

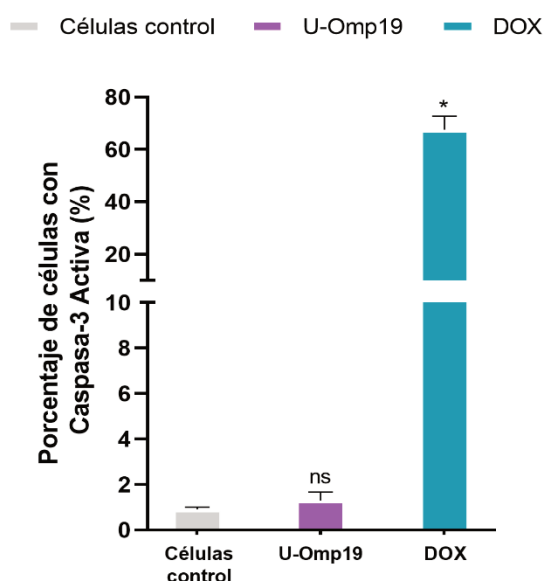


Figura 13. Evaluación de la caspasa-3 escindida en células CHO-K1 tratadas con U-Omp19. Las células CHO-K1 fueron incubadas durante 48 h con U-Omp19 (100 μ g/ml), Doxorrubicina (DOX, 50 μ g/ml; control positivo) o medio DMEM-F12-SFB (células control, sin tratamiento). La cantidad de caspasa-3 escindida se determinó por citometría de flujo. Los resultados se presentan como media $\pm$ desviación estándar del porcentaje de células con caspasa-3 activa respecto a las células control. El símbolo (*) indica diferencias significativas respecto a las células control ($p < 0,05$), ns: diferencia no significativa ($p > 0,05$).

Estos resultados coinciden con los obtenidos previamente mediante el ensayo de Anexina V-FITC/IP (ítem 5.1.a.2), en el cual el tratamiento con U-Omp19 no provocó un aumento significativo en las poblaciones celulares en apoptosis temprana o tardía,

manteniéndose los valores por debajo del 10% y en niveles comparables al grupo control.

4.1.a.4 Estudio de la progresión del ciclo celular

La distribución de las células CHO-K1 en las distintas fases del ciclo celular fue analizada mediante citometría de flujo utilizando tinción con IP, luego de 48 h de exposición a U-Omp19. Como controles se incluyeron células sin tratar (células control), células tratadas con DOX (14µg/ml) y células tratadas con MMC (0,5µg/ml), utilizado como control positivo debido a su capacidad conocida para alterar la progresión del ciclo celular. La Figura 14 muestra los histogramas representativos del ciclo celular para cada condición experimental.

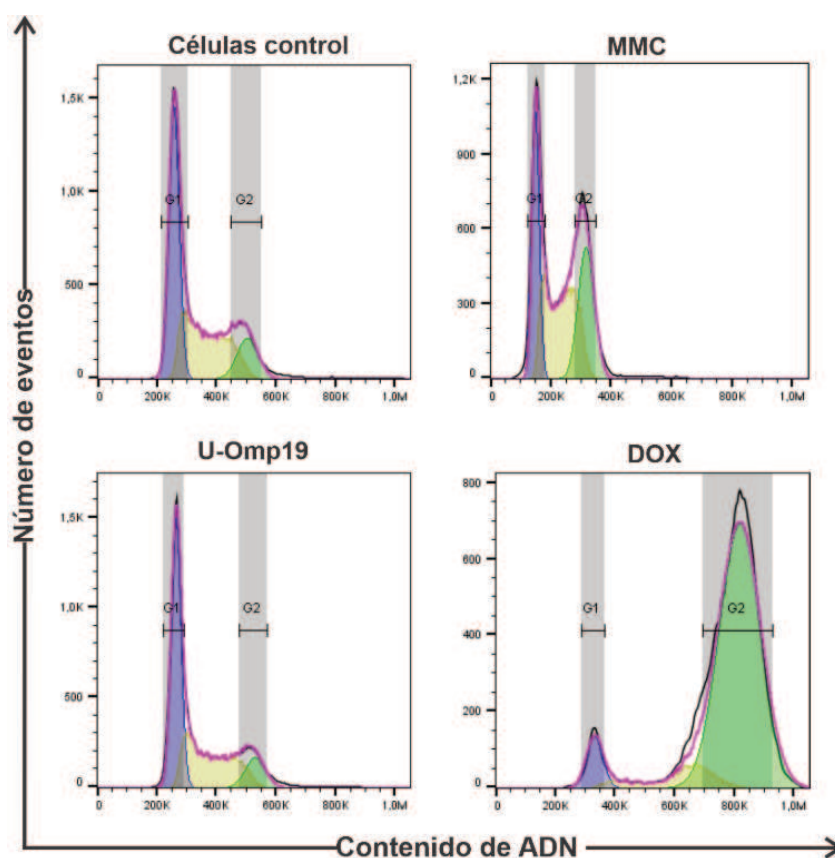


Figura 14. Análisis del ciclo celular en células CHO-K1 tratadas con U-Omp19 mediante citometría de flujo. Los histogramas representan la distribución de las células en las distintas fases del ciclo celular (G0/G1, S y G2/M) según el contenido de ADN, determinado mediante tinción con ioduro de propidio (IP) luego de 48 h de tratamiento con U-Omp19. Se incluyen células control (células sin tratar) y controles positivos tratados con MMC (0,5µg/ml) y DOX (14µg/ml).

En la Figura 15 se muestra la comparación cuantitativa de los porcentajes de células en cada fase del ciclo celular. En la fase G0/G1, el tratamiento con U-Omp19 no produjo

variaciones significativas respecto a las células control ($p>0,05$). En contraste, las células tratadas con MMC y DOX mostraron diferencias significativas en comparación con las células control ($p<0,05$), lo que sugiere una alteración en esta fase inducida por estos compuestos.

Respecto a la fase S, no se observaron diferencias significativas entre las células tratadas con U-Omp19 y las células control ($p>0,05$). De manera similar, no se observaron diferencias entre las células control y aquellas tratadas con MMC y DOX ($p>0,05$), indicando que ninguno de los tratamientos evaluados alteró sustancialmente esta fase.

En cuanto a la fase G2/M, las células tratadas con U-Omp19 no presentaron diferencias significativas respecto a las células control ($p>0,05$). Por el contrario, las células expuestas a MMC y DOX mostraron un incremento significativo en la proporción de células en G2/M ($p<0,05$), lo cual refleja la capacidad de ambos compuestos para inducir una detención del ciclo celular en esta fase.

En conjunto, estos resultados indican que U-Omp19 no induce alteraciones en la progresión del ciclo celular de células CHO-K1, lo cual es consistente con la ausencia de citotoxicidad y de inducción de apoptosis observada en ensayos previos.

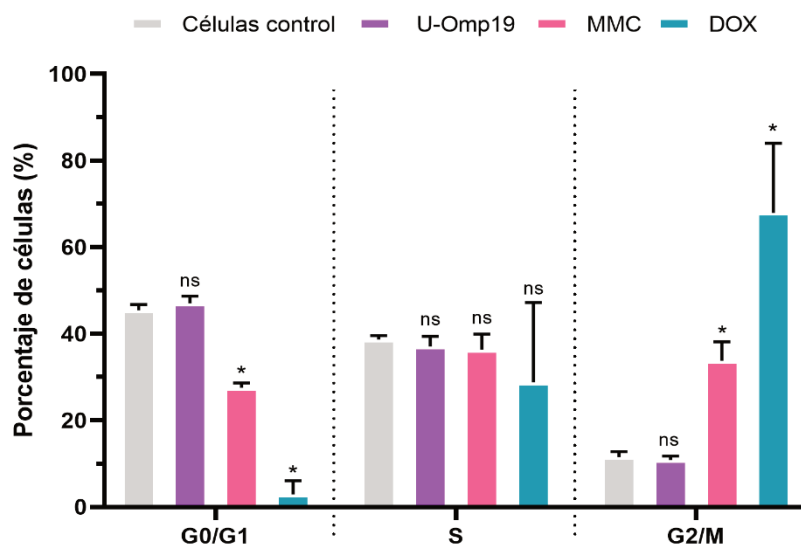


Figura 15. Porcentaje de células CHO-K1 en las distintas fases del ciclo celular (G0/G1, S y G2/M) luego de 48 h de tratamiento con U-Omp19 (100µg/ml), MMC (0,5µg/ml) y DOX (14µg/ml) y células control (medio de cultivo, sin tratamiento). Los porcentajes de células en cada fase se determinaron por citometría de flujo luego de tinción con ioduro de propidio (IP). Los valores se expresan como media $\pm$ desviación estándar. El símbolo (*) indica diferencia significativa ($p<0,05$) respecto a las células control; ns: no significativo ($p>0,05$).

4.1.a.5 Estudio de la producción de especies reactivas del oxígeno

La producción de (ROS se evaluó en células CHO-K1 mediante citometría de flujo utilizando HE.

Como se muestra en la Figura 16, el tratamiento de las células CHO-K1 con U-Omp19 (100 µg/ml) no generó un aumento significativo en la producción de ROS en comparación con las células control ($p>0,05$), lo que indica que el compuesto no induce estrés oxidativo bajo las condiciones experimentales evaluadas. Por el contrario, los controles positivos tratados con DOX (50µg/ml) o H_2O_2 (5%) mostraron un incremento significativo en los niveles de ROS respecto de las células control ($p<0,05$).

Estos resultados sugieren que U-Omp19 no altera el equilibrio redox celular ni genera daño oxidativo en células CHO-K1, en concordancia con la ausencia de efectos citotóxicos observados previamente.

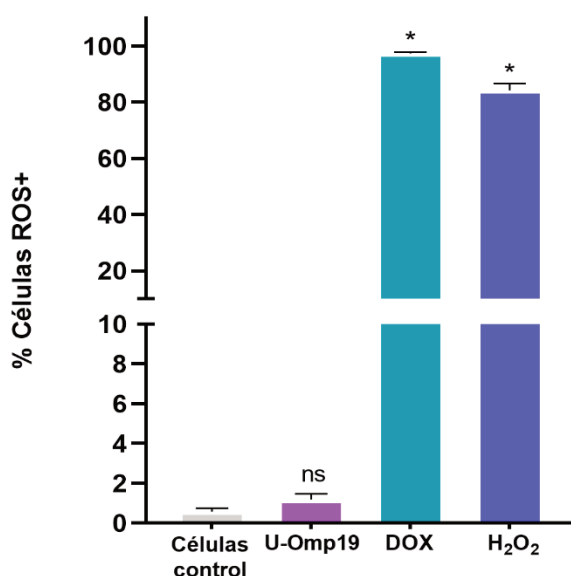


Figura 16. Evaluación de la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) en células CHO-K1 tratadas con U-Omp19 (100µg/ml), DOX (50µg/ml) y H_2O_2 (5%). El porcentaje de células ROS positivas se determinó mediante tinción con hidroetidina (HE) y análisis por citometría de flujo. Los valores se expresan como media $\pm$ desviación estándar. El símbolo (*) indica diferencias significativas con respecto a las células control ($p<0,05$), ns: diferencia no significativa ($p>0,05$).

4.1.a.6 Determinación de γ H2AX como biomarcador de roturas de doble cadena de ADN

En este estudio, se evaluó mediante citometría de flujo el porcentaje de células CHO-K1 positivas para γ H2AX luego de 48 h de tratamiento con U-Omp19 (100 µg/ml), BLM (100 µg/ml, control positivo) o medio de cultivo sin tratamiento (células control).

Los resultados mostraron que el tratamiento con U-Omp19 no indujo un incremento significativo en la señal de γ H2AX en comparación con las células control ($p > 0,05$), lo

que sugiere que, bajo las condiciones experimentales evaluadas, el compuesto no provoca roturas de doble cadena en el ADN. En contraste, las células tratadas con BLM presentaron un aumento significativo de la señal de γ H2AX con respecto a las células control ($p < 0,05$), lo que confirma su efecto genotóxico y valida la sensibilidad y el correcto funcionamiento del ensayo (Figura 17).

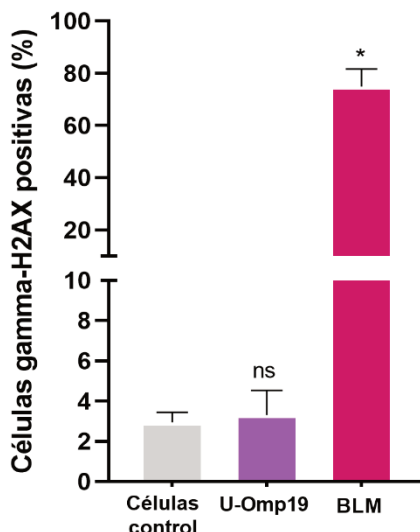


Figura 17. Detección de daño en el ADN mediante cuantificación de γ H2AX en células CHO-K1. Porcentaje de células positivas para γ H2AX (%) después de 48 h de tratamiento con U-Omp19 (100 μ g/ml) y BLM (100 μ g/ml, control positivo), analizado por citometría de flujo. Los valores se expresan como media $\pm$ desviación estándar. El símbolo (*) indica diferencias significativas respecto al control ($p < 0,05$), ns: diferencia no significativa ($p > 0,05$).

4.1.a.7 Estudio de la frecuencia de micronúcleos en presencia de citocalasina-B

Para evaluar el potencial genotóxico de U-Omp19, se determinó la frecuencia de MN en células CHO-K1 mediante el ensayo de MN con bloqueo de la citocinesis (CBMN).

Previamente al análisis de MN, se calculó el Índice de Proliferación Celular con bloqueo de citocinesis (CBPI), a partir del recuento de células mononucleadas, binucleadas y multinucleadas. El CBPI representa el número promedio de divisiones nucleares ocurridas durante el ensayo, siendo un indicador del grado de proliferación celular y de posibles efectos citostáticos inducidos por los tratamientos. Valores de CBPI superior a 1 indican que las células han proliferado activamente durante el período experimental.

Como se muestra en la Tabla 3, todas las condiciones experimentales evaluadas, incluyendo el tratamiento con U-Omp19, los controles positivos (BLM y MMC) y las células control, presentaron valores de CBPI mayores a 1, lo que confirman que las células han proliferado activamente a lo largo del ensayo y no se evidenciaron diferencias significativas ($p > 0,05$) respecto de los valores del control negativo. Estos

resultados muestran que el U-Omp19 no induce alteraciones en la cinética de proliferación celular.

Tabla 3. Índice de proliferación celular en presencia de citocalasina B (CBPI) en células CHO-K1 tratadas con U-Omp19, controles positivos (BLM, MMC) y células control.

Tratamiento	CBPI
	(media $\pm$ DE)
Células control	1,95 $\pm$ 0,01
BLM (Control positivo)	1,89 $\pm$ 0,04
MMC (Control positivo)	1,79 $\pm$ 0,04
U-Omp19	1,86 $\pm$ 0,01

A continuación, se muestran imágenes representativas del ensayo de MN obtenidas a partir de las células CHO-K1 teñidas con Giemsa al 10%, luego de 48 h de exposición a los distintos tratamientos (Figura 18). En estas imágenes se pueden observar células binucleadas con y sin MN, utilizadas para el análisis cuantitativo del daño genético.

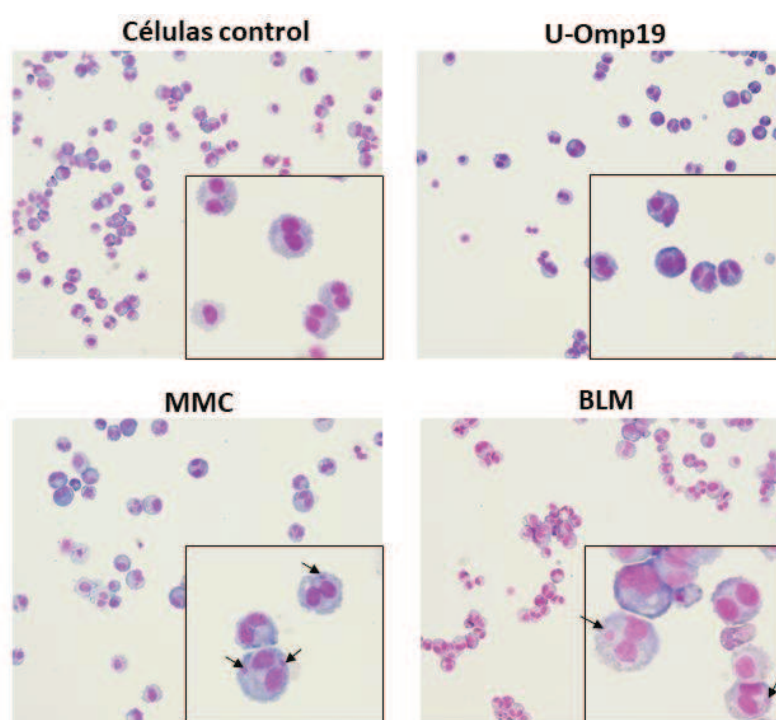


Figura 18. Ensayo de MN con bloqueo de la citocinesis (CBMN) en células CHO-K1. Imágenes representativas de células binucleadas obtenidas tras 48 h de exposición a los diferentes tratamientos: control, U-Omp19, mitomicina C (MMC) y bleomicina (BLM). Las preparaciones fueron teñidas con Giemsa al 10% y observadas con un microscopio Zeiss Axioscope 7 con un

objetivo de 20X. En los recuadros se muestran ampliaciones donde se destacan células binucleadas con (flechas negras) y sin micronúcleos.

Posteriormente, se determinó la frecuencia de MN en células binucleadas (%MN). Los resultados mostraron valores de %MN del 0,8% tanto para las células tratadas con U-Omp19, como para las células control, mientras que los tratamientos con BLM y MMC alcanzaron valores de 6,8% y 24,3%, respectivamente (Figura 19). El %MN en células tratadas con U-Omp19 no presentó diferencias significativas con respecto a las células control ($p>0,05$), lo que sugiere que U-Omp19 no induce genotoxicidad detectable mediante este ensayo. En cambio, tanto BLM como MMC produjeron un aumento significativo en la frecuencia de MN en comparación con las células control ($p<0,05$).

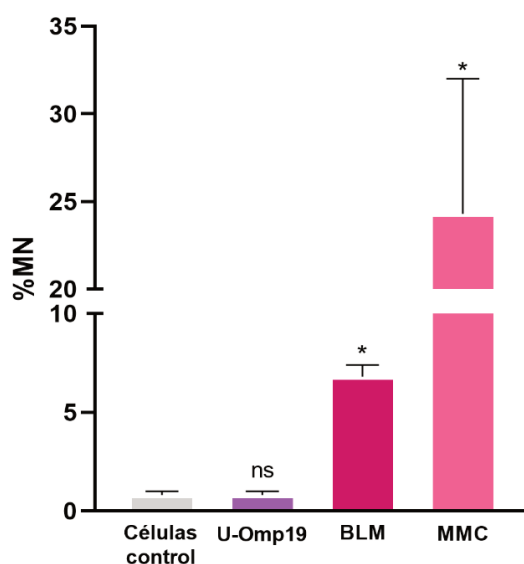


Figura 19. Frecuencia de micronúcleos (%MN) en células CHO-K1 tras 48 h de exposición a U-Omp19, BLM y MMC. Los resultados se expresan como porcentaje de micronúcleos (%MN) en células binucleadas, representados como media $\pm$ desviación estándar. El símbolo (*) indica diferencias significativas respecto a las células control ($p<0,05$); ns: diferencias no significativas ($p>0,05$).

4.1.a.8 Estudio de la inducción de rupturas de cadena simple en el ADN

En el contexto del EC, se evaluó previamente la viabilidad celular para descartar efectos citotóxicos que pudieran interferir en la interpretación del daño en el ADN. Las concentraciones de H_2O_2 utilizadas no generaron efectos citotóxicos significativos sobre la línea celular CHO-K1, ya que el porcentaje de viabilidad celular se mantuvo por encima del 70% en todos los tratamientos analizados (Tabla 4). Estos resultados confirman la idoneidad de las condiciones experimentales empleadas particularmente en términos de viabilidad celular, asegurando que el EC puede aplicarse de manera

adecuada para la evaluación del daño en el ADN en este sistema, sin que los resultados se vean comprometidos por efectos citotóxicos.

Tabla 4. Porcentaje de viabilidad celular (media $\pm$ desviación estándar) a los diferentes tiempos de exposición y concentraciones de H_2O_2 en la línea celular CHO-K1.

Concentración H_2O_2 (μM)	% viabilidad celular (15 min de exposición) Media $\pm$ DE	% viabilidad celular (30min de exposición) Media $\pm$ DE
1000	105,8 $\pm$ 4,8	91,4 $\pm$ 10
100	111,6 $\pm$ 1,5	97,0 $\pm$ 3,5
10	107,6 $\pm$ 1,7	101,3 $\pm$ 0,9

La exposición de las células a distintas concentraciones de H_2O_2 mostró un daño elevado en el ADN a 1000 μM , un daño moderado a 100 μM y ausencia de daño detectable a 10 μM (imágenes no mostradas). En función de estos resultados preliminares, se seleccionó la concentración de 100 μM de H_2O_2 como control positivo para el EC alcalino, ya que permitió inducir daño en el ADN sin comprometer significativamente la citotoxicidad.

La Figura 20 muestra imágenes representativas del EC alcalino obtenidas tras el tratamiento de células CHO-K1 con U-Omp19 (100 $\mu g/ml$), BLM (100 $\mu g/ml$), H_2O_2 y células control (sin tratamiento).

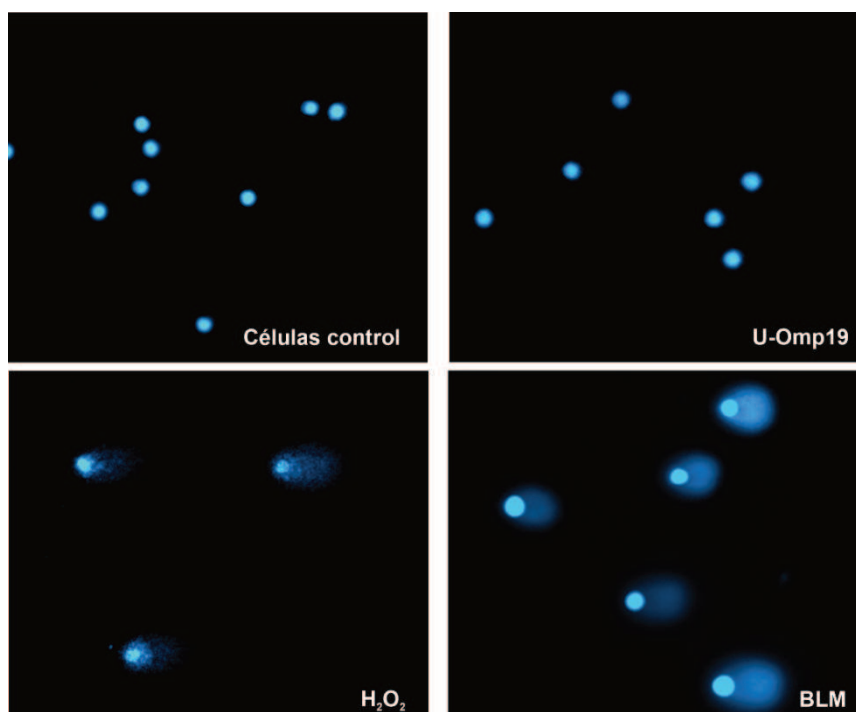


Figura 20. Microfotografías representativas del ensayo cometa en células CHO-K1 tras 48 h de exposición a U-Omp19, bleomicina (BLM) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Las células fueron

teñidas con DAPI observadas mediante microscopía de fluorescencia utilizando el microscopio Zeiss Axio Observer con un objetivo de 20X.

El análisis cuantitativo del ensayo cometa indicó que el tratamiento con U-Omp19 no indujo roturas de cadenas simples en el ADN de las células CHO-K1 a la concentración evaluada, luego de 48 h de exposición. No se observaron diferencias significativas en los parámetros de daño genético en comparación con las células control ($p > 0,05$), lo que sugiere que U-Omp19 no induce genotoxicidad detectable bajo las condiciones experimentales utilizadas. Por el contrario, las células expuestas a H_2O_2 y a BLM (controles positivos) presentaron un incremento significativo en el porcentaje de ADN en la cola del cometa en comparación con las células control ($p < 0,05$), confirmando la sensibilidad y validez del ensayo (Figura 21).

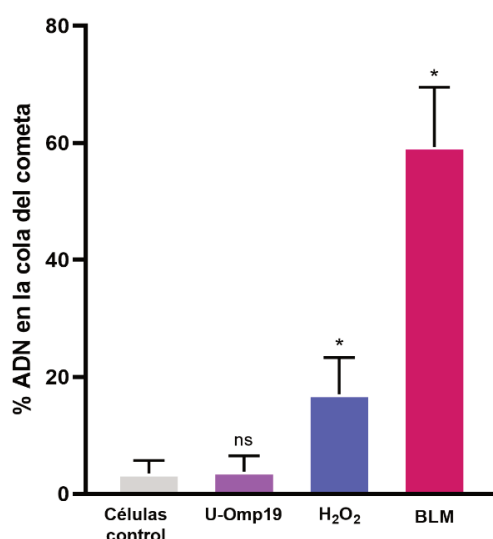


Figura 21. Evaluación del daño en el ADN mediante ensayo cometa en células CHO-K1 tras 48 h de tratamiento con U-Omp19 (100 μ g/ml), BLM (100 μ g/ml) durante 48 h, y H_2O_2 (100 μ M) durante 15 min. El porcentaje de ADN en la cola se utilizó como parámetro cuantitativo del daño genotóxico. Los resultados se expresan como media $\pm$ desviación estándar. El símbolo (*) indica diferencias significativas en comparación con las células control ($p < 0,05$), ns: diferencia no significativa ($p > 0,05$).

4.1.b Resultados obtenidos en la línea celular A549

4.1.b.1 Estudio de la viabilidad celular

El posible efecto citotóxico de U-Omp19 sobre la línea celular A549 se evaluó mediante el ensayo de MTT, luego de 48 h una exposición a diferentes concentraciones del compuesto: 5, 10, 25, 50, 100, 200 y 300 µg/ml. En todas las condiciones ensayadas, la viabilidad celular se mantuvo por encima del 70%, valor considerado no citotóxico según la norma ISO 10993-5:2009, lo que indica la ausencia de efectos citotóxicos inducidos por U-Omp19 en este rango de concentraciones.

En contraste, los agentes citotóxicos utilizados como controles positivos: DOX (0,5, 1, 5, 10, 25, 50, 100, 200 µg/ml), MMC (1, 10, 25, 50, 100, 200, 300 µg/ml) y BLM (0,25, 0,5, 1, 5, 10, 25, 50, 100, 200 µg/ml), generaron una disminución progresiva y dependiente de la concentración en la viabilidad celular de A549 (DOX: $r = -0,91$; MMC: $r = -0,98$; BLM: $r = -0,56$) (Figura 22).

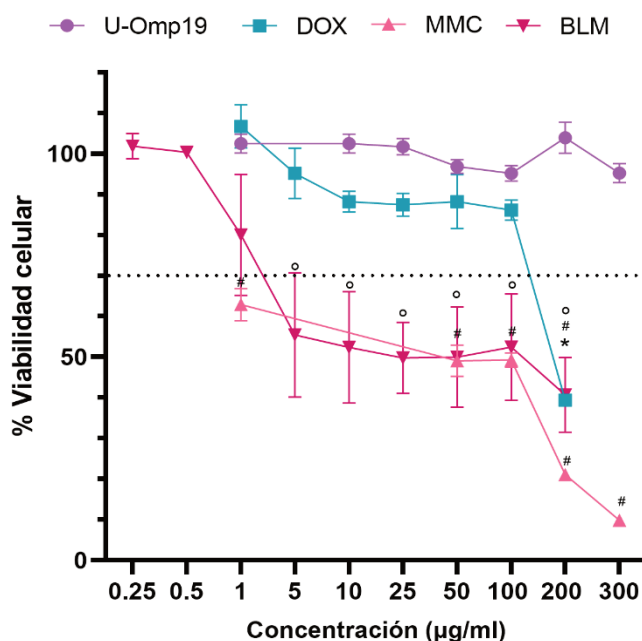


Figura 22. Evaluación de la viabilidad celular de células A549 tras 48 h de exposición a U-Omp19, DOX, MMC y BLM mediante el ensayo de MTT. Los datos se expresan como porcentaje de viabilidad celular respecto al control sin tratamiento (100%), representados como la media $\pm$ desviación estándar, de al menos tres experimentos independientes. La línea punteada indica el umbral del 70% de viabilidad celular, establecido por ISO 10993-5:2009 como valor de referencia para indicar potencial citotóxico. El símbolo (*), (#) y (°), indica diferencia significativa ($p < 0,05$) respecto al control negativo, correspondiendo (*) a DOX, (#) a MMC y (°) a BLM.

Dado que U-Omp19 no presentó efectos citotóxicos en el rango de concentraciones evaluado, se seleccionó la concentración de 100 µg/ml para los estudios posteriores, en concordancia con lo establecido previamente para la línea celular CHO-K1.

4.1.b.2 Evaluación de los mecanismos de muerte celular: apoptosis y necrosis

Con el objetivo de determinar un posible mecanismo de muerte celular inducido por U-Omp19 sobre las células A549, se analizó la proporción de células en diferentes estados fisiológicos mediante citometría de flujo utilizando la tinción Anexina V-FITC/IP. Se evaluaron células crecidas en medio de cultivo (células control, sin tratamiento), células tratadas con U-Omp19 y células tratadas con DOX o H₂O₂ (como controles positivos).

Como se muestra en la Figura 23, las células control presentaron un alto porcentaje de viabilidad (~80%) y bajos niveles de células apoptóticas (<20%) y necróticas (~2%), lo cual refleja un bajo nivel basal de muerte celular en condiciones fisiológicas. El tratamiento con U-Omp19 no produjo cambios significativos en la distribución de las poblaciones celulares respecto al control ($p > 0,05$), lo que indica que no indujo apoptosis ni necrosis. En contraste, las células tratadas con DOX y H₂O₂ mostraron un aumento significativo en el porcentaje de células en apoptosis tardía (~90 %) en comparación con el control ($p < 0,05$), lo que confirma su actividad pro-apoptótica. Asimismo, únicamente el tratamiento con H₂O₂ produjo un incremento significativo en el porcentaje de células necróticas respecto a las células control ($p < 0,05$).

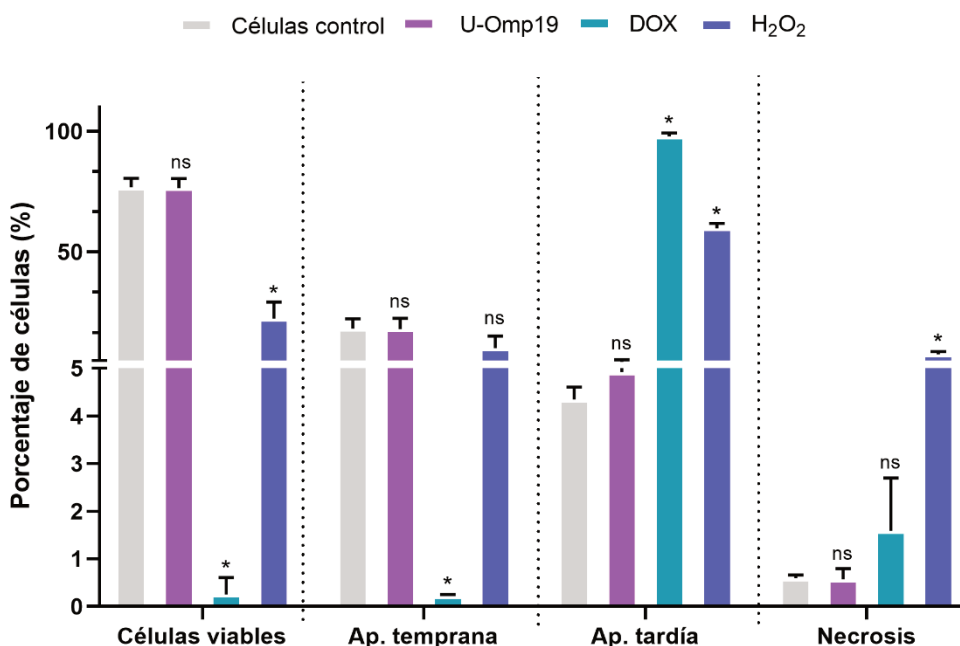


Figura 23. Evaluación del efecto de U-Omp19 sobre la muerte celular por apoptosis/necrosis en células A549. Las células fueron incubadas durante 48 h con U-Omp19 (100 µg/ml) y posteriormente analizadas por citometría de flujo mediante tinción con Anexina V-FITC/PI. Las barras representan los porcentajes de células viables, en apoptosis temprana (Ap. Temprana), en apoptosis tardía (Ap. Tardía) y en necrosis. Las células control se cultivaron en medio DMEM-F12-SFB, mientras que DOX y H₂O₂ se utilizaron como controles positivos de apoptosis. Los

valores se expresan como media $\pm$ desviación estándar. El símbolo (*) indica diferencia significativa ($p < 0,05$) respecto a las células control; ns: diferencia no significativa ($p > 0,05$).

4.1.b.3 Evaluación de la activación de la caspasa-3

La activación de la caspasa-3 se analizó en las células A549 tratadas durante 48 h con U-Omp19. No se detectaron diferencias significativas en los niveles de caspasa-3 activa en comparación con las células control ($p > 0,05$). Por el contrario, el tratamiento con DOX (control positivo) produjo un incremento significativo en la señal de caspasa-3 con respecto a las células control ($p > 0,05$) (Figura 24).

Estos resultados son concordantes con los obtenidos previamente mediante la tinción de Anexina V-FITC/IP (sección 4.1.b.2), donde U-Omp19 no provocó un aumento significativo en las poblaciones celulares en apoptosis temprana o tardía, manteniéndose por debajo del 10% y en niveles comparables al grupo control.

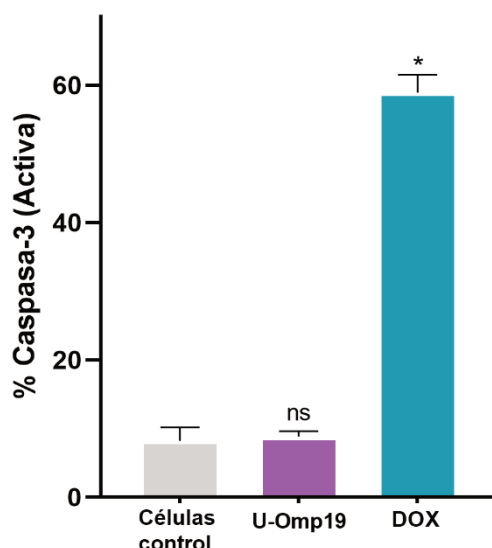


Figura 24. Evaluación de la caspasa-3 escindida en células A549 tratadas con U-Omp19. Las células A549 fueron incubadas durante 48 h con U-Omp19 (100 $\mu\text{g/ml}$), Doxorrubicina (DOX, 50 $\mu\text{g/ml}$; control positivo) o medio DMEM-F12-SFB (células control, sin tratamiento). La cantidad de caspasa-3 escindida se determinó por citometría de flujo. Los resultados se presentan como media $\pm$ desviación estándar del porcentaje de células con caspasa-3 activa respecto a las células control. El símbolo (*) indica diferencias significativas respecto a las células control ($p < 0,05$), ns: diferencia no significativa ($p > 0,05$).

4.1.b.4 Estudio de la progresión del ciclo celular

La distribución de las células A549 en las distintas fases del ciclo celular fue analizado mediante citometría de flujo utilizando tinción con IP, luego de 48 h de exposición a U-Omp19 (100 $\mu\text{g/ml}$). Como controles se incluyeron células sin tratar (células control) y

células tratadas con MMC (0,05 $\mu\text{g/ml}$). La Figura 25 muestra histogramas representativos del ciclo celular correspondiente a cada condición experimental.

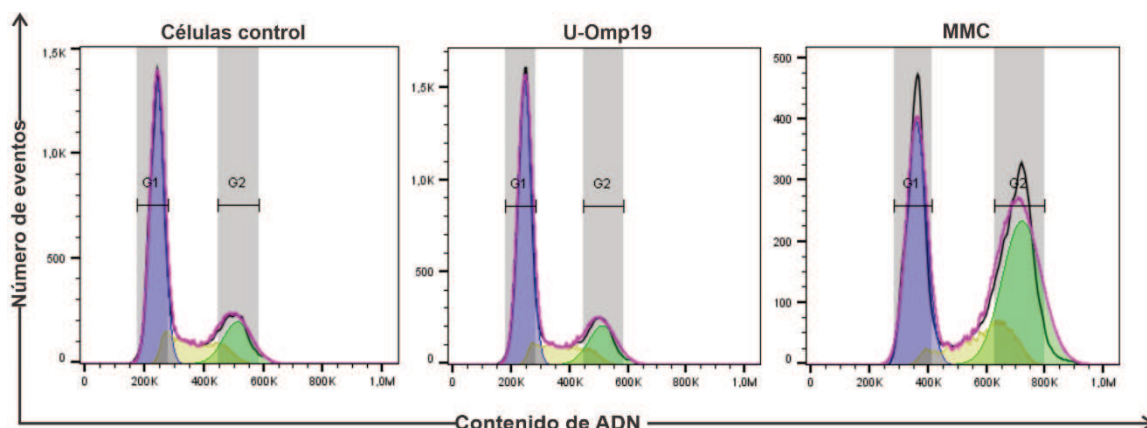


Figura 25. Análisis del ciclo celular en células A549 tratadas con U-Omp19 mediante citometría de flujo. Los histogramas representan la distribución de las células en las distintas fases del ciclo celular (G0/G1, S y G2/M) según el contenido de ADN, determinado mediante tinción con yoduro de propidio (IP) luego de 48 h de tratamiento con U-Omp19. Se incluyen células control (células sin tratar) y control positivo tratado con MMC (0,5 $\mu\text{g/ml}$).

La Figura 26 representa la comparación cuantitativa de los porcentajes de células en cada fase del ciclo celular. En la fase G0/G1, el tratamiento con U-Omp19 no produjo cambios significativos respecto a las células control ($p > 0,05$), mientras que el tratamiento con MMC mostró una diferencia significativa ($p < 0,05$), evidenciando una alteración en esta fase del ciclo. En la fase S, ninguno de los tratamientos evaluados, incluido U-Omp19 y MMC, generó cambios significativos respecto a las células control ($p > 0,05$). De manera similar, en la fase G2/M, las células tratadas con U-Omp19 no mostraron variaciones significativas en la distribución celular respecto al grupo control ($p > 0,05$). Por el contrario, el tratamiento con MMC produjo un incremento significativo ($p < 0,05$) en la proporción de células en G2/M ($p < 0,05$), indicando un bloqueo del ciclo celular en esta fase, impidiendo que las células continúen su ciclo normal.

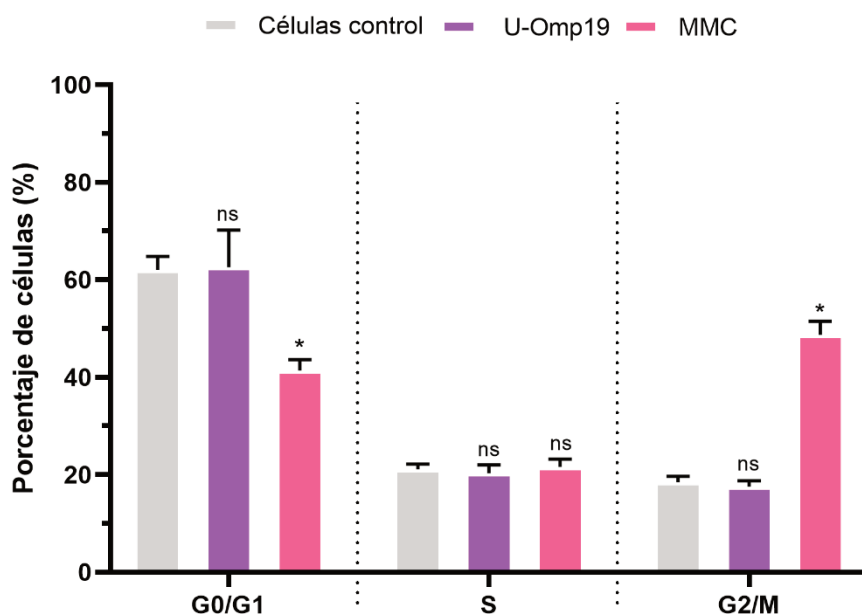


Figura 26. Porcentaje de células A549 en las distintas fases del ciclo celular (G0/G1, S y G2/M) luego de 48h de tratamiento con U-Omp19 (100µg/ml), MMC (0,05µg/ml, control positivo) y células control. Los porcentajes de células en cada fase se determinaron por citometría de flujo luego de tinción con ioduro de propidio (IP). Los valores se expresan como media $\pm$ desviación estándar. El símbolo (*) indica diferencia significativa respecto al control ($p < 0,05$), ns: diferencias no significativas ($p > 0,05$).

En conjunto, estos resultados indican que U-Omp19 no induce alteraciones en la progresión del ciclo celular de las células A549, lo cual es consistente con la ausencia de citotoxicidad observada en ensayos descritos previamente.

4.1.b.5 Estudio de la producción de especies reactivas del oxígeno

La producción de ROS se evaluó en células A549 se evaluó mediante citometría de flujo, utilizando HE para la detección de anión O_2^- intracelular. Como se observa en la Figura 27, el tratamiento con U-Omp19 (100 µg/ml) durante 48 h no generó un aumento significativo en la proporción de células ROS positivas en comparación con las células control ($p > 0,05$), lo que indica que el compuesto no induce estrés oxidativo bajo las condiciones experimentales evaluadas. Por el contrario, los tratamientos con DOX (50 µg/ml) y H_2O_2 (5%), utilizados como controles positivos, produjeron un incremento significativo en los niveles de ROS respecto a las células control ($p < 0,05$).

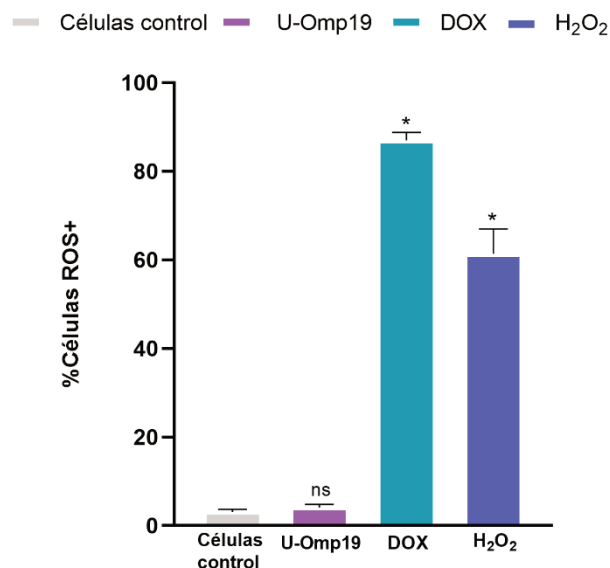


Figura 27. Evaluación de la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) en células A549 tratadas con U-Omp19 (100µg/ml), DOX (50µg/ml) y H₂O₂ (5%). El porcentaje de células ROS positivas se determinó mediante tinción con hidroetidina (HE) y análisis por citometría de flujo. Los valores se expresan como media $\pm$ desviación estándar. El símbolo (*) indica diferencias significativas con respecto a las células control ($p < 0,05$), ns: diferencia no significativa ($p > 0,05$).

4.1.b.6 Determinación de γ H2AX como biomarcador de roturas de doble cadena de ADN

El daño genómico asociado a roturas de doble cadena de ADN se evaluó mediante la cuantificación de γ H2AX en células A549 mediante citometría de flujo, luego de 48 h de tratamiento con U-Omp19 (100 µg/ml). Se incluyeron células sin tratamiento como control negativo y células tratadas con BLM (100 µg/ml) como control positivo.

Como se observa en la Figura 28, el tratamiento con U-Omp19 no indujo un incremento significativo en el porcentaje de células γ H2AX positivas en comparación con las células control ($p > 0,05$), lo que sugiere que el compuesto no induce roturas de doble cadena en el ADN bajo las condiciones experimentales evaluadas. En contraste, las células tratadas con BLM mostraron un aumento significativo en la señal de γ H2AX con respecto al control ($p < 0,05$), confirmando su efecto genotóxico.

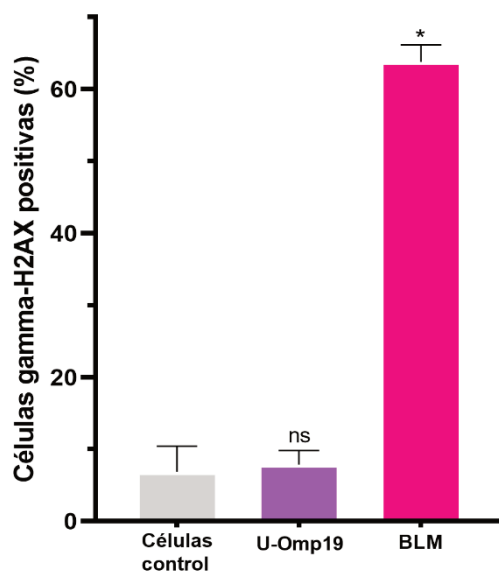


Figura 28. Detección de daño en el ADN mediante cuantificación de γ H2AX en células A549. Porcentaje de células A549 positivas para γ H2AX (%) después de 48 h de tratamiento con U-Omp19 (100 μ g/ml) y BLM (100 μ g/ml, control positivo analizado por citometría de flujo. Los valores se expresan como media $\pm$ desviación estándar. El símbolo (*) indica diferencias significativas respecto al control ($p < 0,05$), ns: diferencia no significativa ($p > 0,05$).

4.1.b.7 Estudio de la frecuencia de MN en presencia de citocalasina-B

Para evaluar el potencial genotóxico de U-Omp19 en la línea celular A549, se determinó la frecuencia de MN y CBPI mediante el ensayo de bloqueo de la citocinesis (CBMN), utilizando citocalasina-B.

Como se muestra en la Tabla 5, todas las condiciones experimentales evaluadas, incluyendo el tratamiento con U-Omp19 (100 μ g/ml), el control positivo (BLM, 0,5 μ g/ml) y las células control, presentaron valores de CBPI mayores a 1, confirmando la proliferación activa de las células a lo largo del ensayo, y no se evidenciaron diferencias significativas ($p > 0,05$) respecto de los valores del control negativo. Estos resultados muestran que el U-Omp 19 no induce alteraciones en la cinética de proliferación celular.

Tabla 5. Índice de proliferación celular en presencia de citocalasina-B (CBPI) en células A549.

Tratamiento	CBPI (media $\pm$ DE)
Células control	1,85 $\pm$ 0,01
Control positivo (BLM)	1,75 $\pm$ 0,05
U-Omp19	1,79 $\pm$ 0,02

En la Figura 29, se presentan imágenes representativas del ensayo de MN realizado en células A549, obtenidas tras la tinción con Giemsa al 10% luego de 48 h de exposición a los distintos tratamientos. En las imágenes se pueden observar células binucleadas, con y sin micronúcleos, utilizadas para el análisis cuantitativo del daño genético.

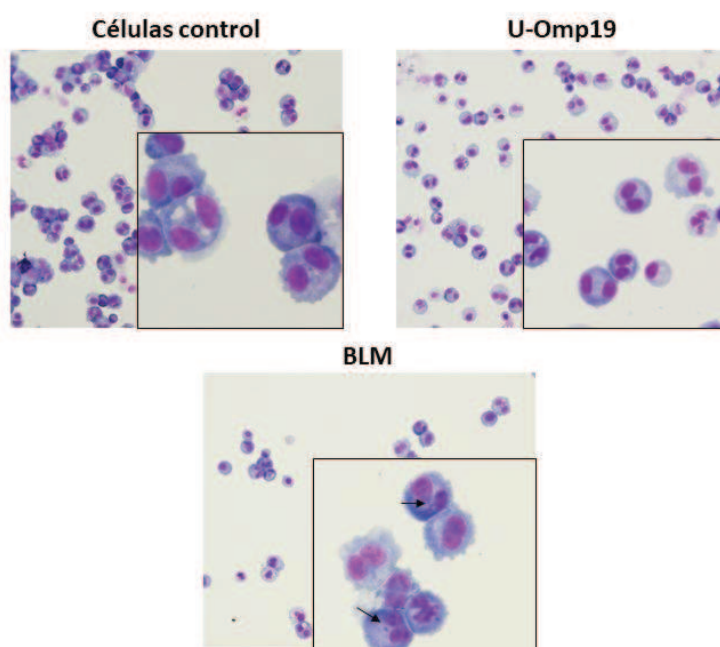


Figura 29. Ensayo de micronúcleos con bloqueo de la citocinesis (CBMN) en células A549. Imágenes representativas de células binucleadas obtenidas tras 48 h de exposición a los diferentes tratamientos: control, U-Omp19 y bleomicina (BLM). Las preparaciones fueron teñidas con Giemsa al 10% y observadas con un microscopio Zeiss Axioscope 7. En los recuadros se muestran ampliaciones donde se destacan células binucleadas con (flechas negras) y sin micronúcleos con un objetivo de 20X.

La cuantificación de MN en células binucleadas mostró valores de 2,3% para las células tratadas con U-Omp19, 1,4% para las células control y 7,3% para las células tratadas con BLM (Figura 30). El análisis estadístico indicó que el tratamiento con U-Omp19 no produjo un aumento significativo en la frecuencia de MN con respecto a las células

control ($p>0,05$), lo que sugiere la ausencia de genotoxicidad detectable bajo las condiciones evaluadas. En cambio, el tratamiento con BLM produjo un aumento significativo en la frecuencia de MN en comparación con las células control ($p<0,05$), confirmando la sensibilidad y validez del ensayo.

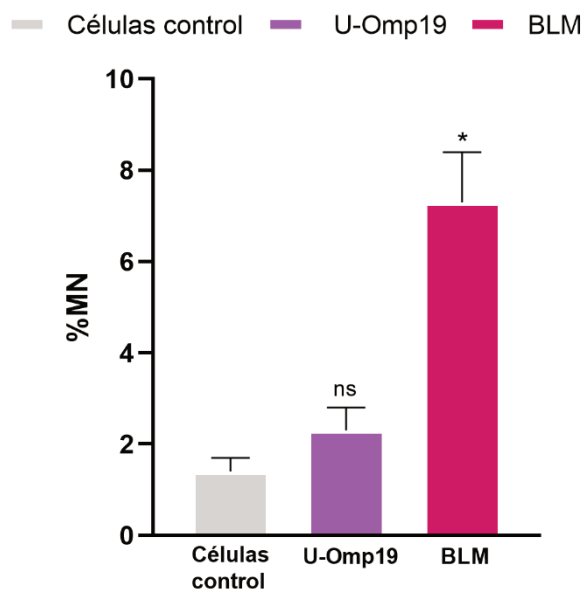


Figura 30. Frecuencia de micronúcleos (%MN) en células A549 tras 48 h de exposición a U-Omp19 y BLM. Los resultados se expresan como porcentaje de micronúcleos (%MN) en células binucleadas, representados como media $\pm$ desviación estándar. El símbolo (*) indica diferencias significativas respecto a las células control ($p<0,05$); ns: diferencias no significativas ($p>0,05$).

4.1.b.8 Estudio de la inducción de rupturas de cadena simple en el ADN

En concordancia con el abordaje experimental previamente aplicado en la línea celular CHO-K1 (sección 4.1.a.8), se evaluó el potencial genotóxico de U-Omp19 en células A549 mediante el EC alcalino. De manera preliminar, se analizó la viabilidad celular tras la exposición a distintas concentraciones de H_2O_2 , con el objetivo de seleccionar una condición que permitiera inducir daño en el ADN sin generar citotoxicidad significativa que pudiera interferir en la interpretación de los resultados.

Como se muestra en la Tabla 6, ninguna de las concentraciones de H_2O_2 evaluadas produjo una disminución en la viabilidad celular, manteniéndose los valores por encima del 70% tanto a los 15 como a los 30 min de exposición. Estos resultados confirman, al igual que en CHO-K1, la idoneidad de las condiciones experimentales empleadas para el análisis específico de rupturas de cadena simple del ADN.

Tabla 6. Porcentaje de viabilidad celular (media $\pm$ desviación estándar). a los diferentes tiempos de exposición y concentraciones de H_2O_2 en la línea celular A549.

Concentraciones de H_2O_2 (μM)	% viabilidad celular (15min de exposición) Media $\pm$ DE	% viabilidad celular (30min de exposición) Media $\pm$ DE
1000	106,9 $\pm$ 5,7	110,1 $\pm$ 2,3
100	102,5 $\pm$ 9,0	104,2 $\pm$ 10,6
10	108,9 $\pm$ 10,2	105,8 $\pm$ 5,8

En función de estos resultados, se seleccionó la concentración de 100 μM de H_2O_2 como control positivo del ensayo cometa alcalino, dado que permitió detectar daño genético sin comprometer la viabilidad celular, en concordancia con lo observado previamente en la línea CHO-K1.

La Figura 31 muestra imágenes representativas del EC alcalino obtenidas tras el tratamiento de células A549 con U-Omp19 (100 $\mu g/ml$), H_2O_2 (control positivo) y en las células control sin tratamiento.

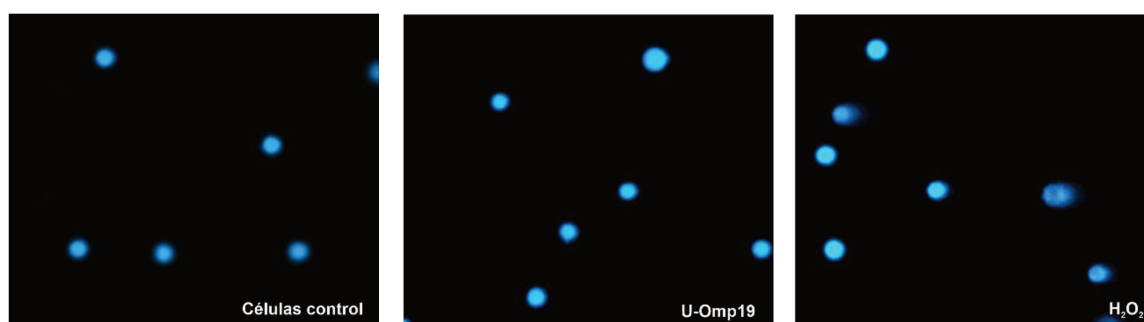


Figura 31. Microfotografías representativas del ensayo cometa en células A549 tras 48 h de exposición a U-Omp19 y peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Las células fueron teñidas con DAPI y observadas mediante microscopía de fluorescencia utilizando el microscopio Zeiss Axio Observer con un objetivo de 20X.

El análisis cuantitativo del daño genético indicó que el tratamiento con U-Omp19 no indujo un aumento significativo en el porcentaje de ADN en la cola en comparación con las células control ($p > 0,05$), lo que sugiere que no genera roturas de cadena simple en el ADN de células A549 bajo las condiciones evaluadas. Por el contrario, las células expuestas a H_2O_2 presentaron un incremento significativo en el daño genético comparación con las células control ($p < 0,05$) (Figura 32).

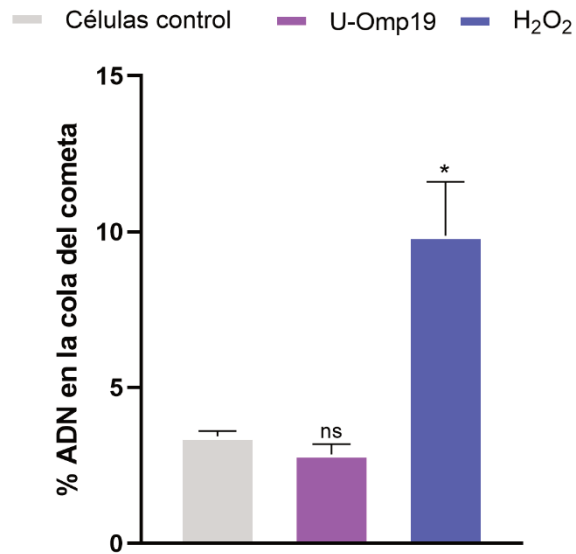


Figura 32. Evaluación del daño en el ADN mediante ensayo cometa en células A549 tras 48 h de tratamiento con U-Omp19 (100 µg/ml) durante 48 h, y H₂O₂ (100 µM) durante 15 min. El porcentaje de ADN en la cola se utilizó como parámetro cuantitativo del daño genotóxico. Los resultados se expresan como media $\pm$ desviación estándar. El símbolo (*) indica diferencias significativas en comparación con las células control ($p < 0,05$), ns: diferencia no significativa ($p > 0,05$).

4.2 ESTUDIO *IN VITRO* DE CITOTOXICIDAD Y GENOTOXICIDAD DE BSY02

4.2.a Resultados obtenidos en la línea celular CHO-K1

4.2.a.1 Evaluación de la viabilidad celular mediante el ensayo de MTT

El tratamiento de las células CHO-K1 durante 48 h con diferentes concentraciones de BSY02 (0,2, 0,34, 0,5, 0,7, 0,84, 1, 5, 10, 50 $\mu\text{g/ml}$, equivalentes a 20, 40, 60, 80, 100, 120, 590, 1200, 5600 UI/ml, respectivamente) no produjo alteraciones morfológicas evidentes en las células, manteniéndose el aspecto característico de la línea celular en condiciones de cultivo normales (Figura 33).

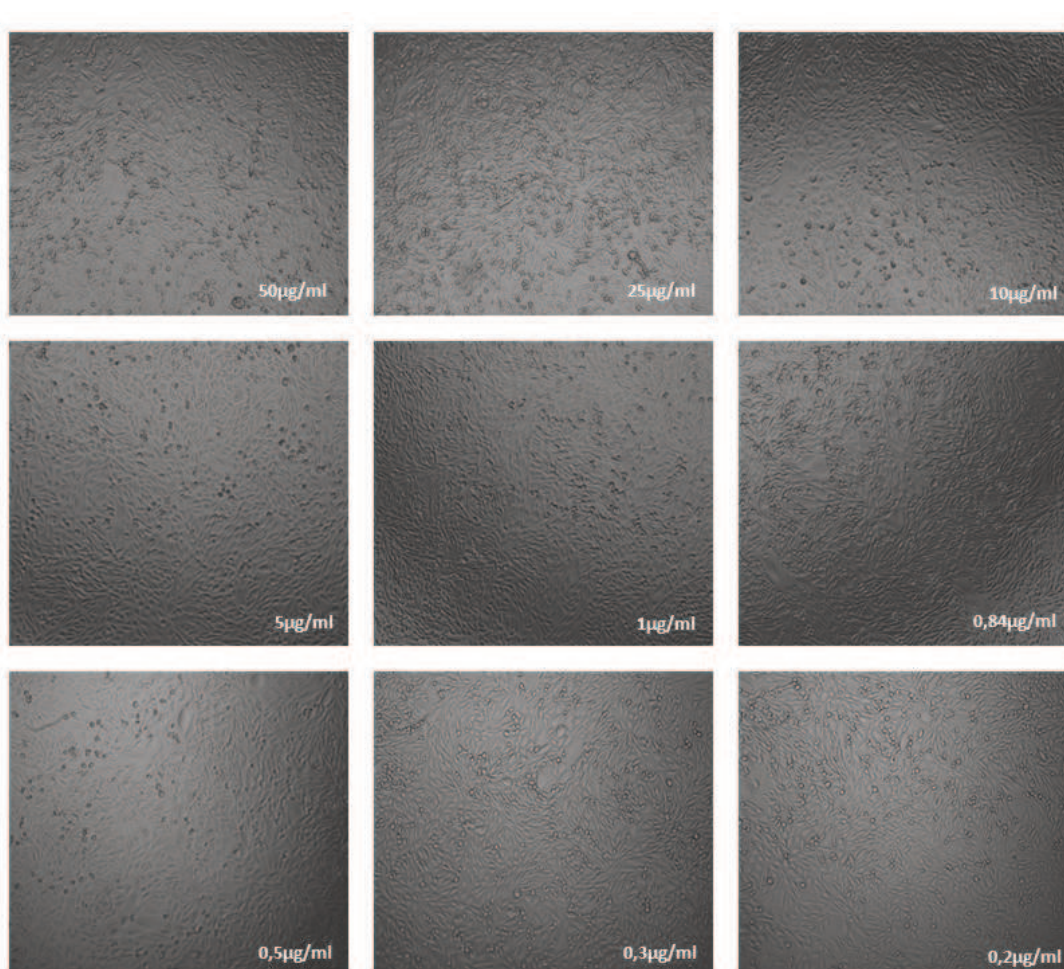


Figura 33. Microfotografías representativas de células CHO-K1 luego de 48 h de exposición a diferentes concentraciones de BSY02 obtenidas utilizando un microscopio Zeiss Axio Observer con un objetivo de 10X.

La evaluación de la citotoxicidad mediante el ensayo MTT mostró que BSY02 no produjo efectos citotóxicos sobre las células CHO-K1 en el rango de concentraciones ensayado, ya que la viabilidad celular se mantuvo por encima del 70% en todas las condiciones evaluadas tras 48 h de tratamiento. Por el contrario, los controles positivos DOX (1 - 300

$\mu\text{g/ml}$) y MMC (0,5 - 300 $\mu\text{g/ml}$) indujeron una disminución progresiva y dependiente de la concentración en la viabilidad celular (DOX: $r = -0,75$; MMC: $r = -0,7$), confirmando su reconocida actividad citotóxica sobre esta línea celular (Figura 34).

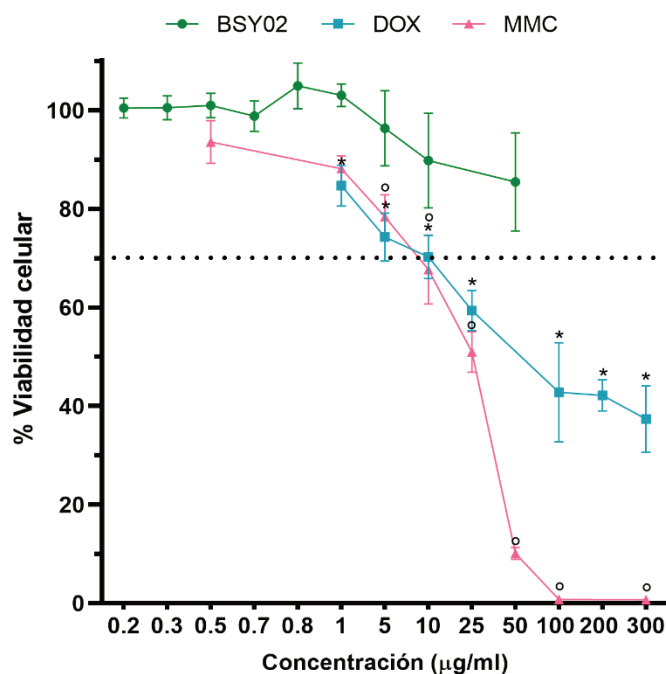


Figura 34. Evaluación de la viabilidad celular de células CHO-K1 tras 48 h de exposición a BSY02, DOX, MMC mediante el ensayo de MTT. Los datos se expresan como porcentaje de viabilidad celular respecto al control sin tratamiento (100%), representados como la media $\pm$ desviación estándar, de al menos tres experimentos independientes. La línea punteada indica el umbral del 70% de viabilidad celular, establecido por ISO 10993-5:2009 como valor de referencia para indicar potencial citotóxico. El símbolo (*) y (°) indica diferencia significativa ($p < 0,05$) respecto al control negativo, correspondiendo (*) a DOX y (°) a MMC.

Dado que BSY02 no presentó actividad citotóxica detectable, se seleccionó la concentración de 0,34 $\mu\text{g/ml}$ (equivalente a 40 UI/ml) como concentración representativa para los ensayos posteriores. Esta selección se fundamentó tanto en la ausencia de efectos citotóxicos como en su relevancia biológica, considerando antecedentes de estudios de farmacocinética de moléculas estructuralmente similares como la rhEPO, que reportan concentraciones terapéuticas entre 2,5 - 4 UI/ml (Macdougall et al., 1991.; Oh et al., 2015). Es decir que la concentración utilizada equivale a unas 10 - 16 veces superior a la concentración sérica máxima esperable.

4.2.a.2 Evaluación de los mecanismos de muerte celular: apoptosis y necrosis

Con el objetivo de determinar si el tratamiento con BSY02 inducía muerte celular programada, se analizó el perfil apoptótico de las células CHO-K1 mediante citometría de flujo, utilizando el kit de detección Anexina V-FITC/PI. Las células fueron incubadas

durante 48 h con BSY02 (0,34 $\mu\text{g/ml}$), Se incluyeron como controles positivos DOX (50 $\mu\text{g/ml}$) y H_2O_2 (al 5%), así como células control cultivadas en medio DMEM-F12-SFB.

Como se observa en la Figura 35, las células control mostraron un elevado porcentaje de viabilidad celular ($\sim 98\%$), con una baja proporción de células en apoptosis ($<2\%$) y necrosis ($\sim 0,3\%$), lo cual refleja un bajo nivel basal de muerte celular en condiciones fisiológicas.

Las células tratadas con BSY02 no evidenciaron un aumento significativo en la proporción de células apoptóticas ni necróticas en comparación con el grupo control ($p > 0,05$), lo que indica que, en las condiciones evaluadas, BSY02 no induce muerte celular por apoptosis ni necrosis en la línea CHO-K1. En cambio, los tratamientos con DOX y H_2O_2 generaron un aumento significativo en la población de células apoptóticas y necróticas respecto al control ($p < 0,05$).

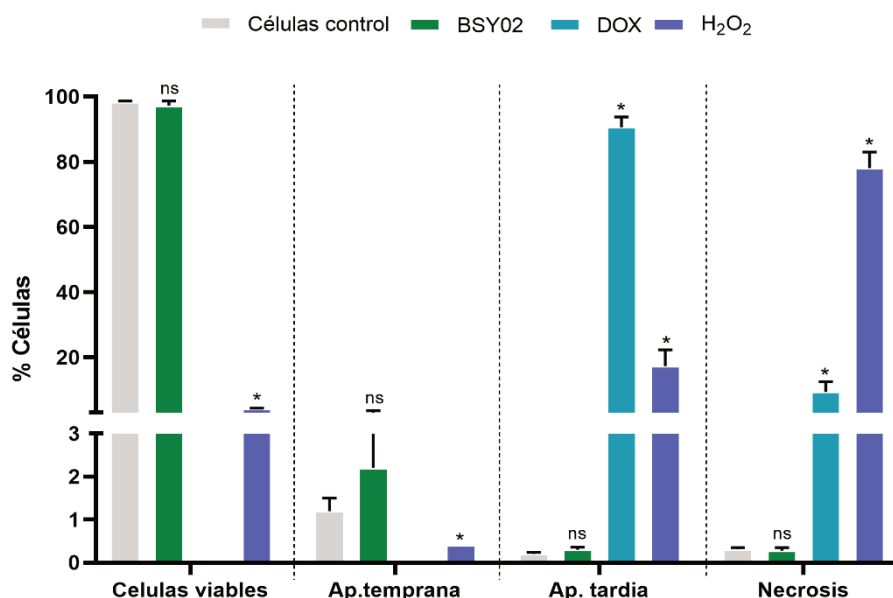


Figura 35. Evaluación del efecto de BSY02 sobre la muerte celular por apoptosis/necrosis en células CHO-K1. Las células fueron incubadas durante 48 h con BSY02 (0,34 $\mu\text{g/ml}$) y posteriormente analizadas por citometría de flujo mediante tinción con Anexina V-FITC/PI. Las barras representan los porcentajes de células viables, en apoptosis temprana (Ap. Temprana), en apoptosis tardía (Ap. Tardía) y en necrosis. Las células control se cultivaron en medio DMEM-F12-SFB, mientras que DOX y H_2O_2 se utilizaron como controles positivos de apoptosis. Los valores se expresan como media $\pm$ desviación estándar. El símbolo (*) indica diferencia significativa ($p < 0,05$) respecto a las células control; ns: diferencia no significativa ($p > 0,05$).

4.2.a.3 Evaluación de la activación de la caspasa-3

Las células CHO-K1 fueron tratadas durante 48 h con BSY02 a una concentración de 0,34 $\mu\text{g/ml}$ y comparadas con células control (células cultivadas en medio DMEM-F12-SFB) y células tratadas con DOX (50 $\mu\text{g/ml}$) como control positivo.

Los resultados mostraron que el tratamiento con BSY02 no indujo un incremento significativo en la proporción de células positivas para caspasa-3 respecto al grupo control ($p > 0,05$), lo que indica ausencia de activación de la vía apoptótica mediada por esta vía. En contraste, las células tratadas con DOX presentaron un aumento significativo en los niveles de caspasa-3 activa en comparación con las células control ($p < 0,05$), confirmando su efecto proapoptótico esperado (Figura 36).

Estos resultados son consistentes con los obtenidos previamente mediante la tinción de Anexina V-FITC/IP, donde la BSY02 no provocó un aumento significativo de las poblaciones celulares en apoptosis temprana o tardía, las cuales se mantuvieron por debajo del 10% y en valores comparables a los del grupo control.

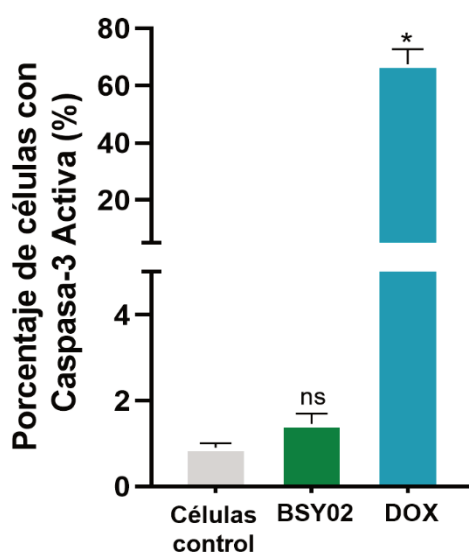


Figura 36. Evaluación de la caspasa-3 escindida en células CHO-K1 tratadas con BSY02. Las células CHO-K1 fueron incubadas durante 48 h con BSY02 (0,34 $\mu\text{g/ml}$), DOX (50 $\mu\text{g/ml}$; control positivo) o medio DMEM-F12-SFB (células control, sin tratamiento). La cantidad de caspasa-3 escindida se determinó por citometría de flujo. Los resultados se presentan como media $\pm$ desviación estándar del porcentaje de células con caspasa-3 activa respecto a las células control. El símbolo (*) indica diferencias significativas respecto a las células control ($p < 0,05$), ns: diferencia no significativa ($p > 0,05$).

4.2.a.4 Estudio de la progresión del ciclo celular

La distribución de las células CHO-K1 en las distintas fases del ciclo celular fue analizada mediante citometría de flujo utilizando tinción con IP, luego de 48 h de exposición a BSY02 (0,34 $\mu\text{g/ml}$). Se incluyeron como controles células sin tratar (células control) y células tratadas con MMC (0,5 $\mu\text{g/ml}$).

La Figura 37 muestra los histogramas representativos del contenido de ADN correspondientes a cada condición experimental.

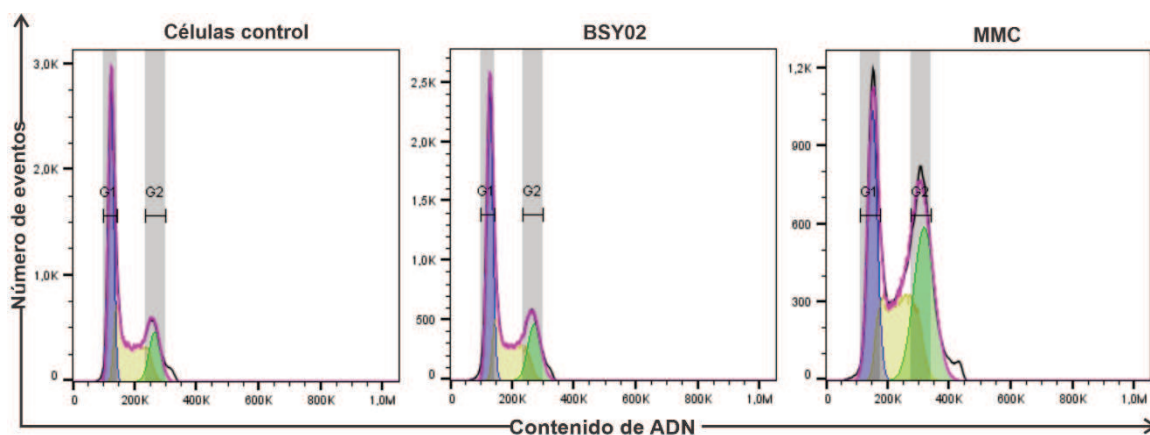


Figura 37. Histogramas representativos del análisis del ciclo celular en células CHO-K1 tras 48 h de tratamiento. Se muestran los perfiles de distribución del contenido de ADN correspondientes a células control (sin tratar), tratadas con BSY02 (0,34 $\mu\text{g/ml}$) y con MMC (0,5 $\mu\text{g/ml}$, control positivo). Las regiones sombreadas indican las fases G0/G1 y G2/M del ciclo celular, determinadas según el contenido de ADN medido mediante tinción con yoduro de propidio (IP).

En la Figura 38 se muestra la comparación cuantitativa de los porcentajes de células en cada fase del ciclo celular. En la fase G0/G1, el tratamiento con BSY02 no produjo diferencias significativas respecto a las células control ($p > 0,05$), mientras que el tratamiento con MMC provocó una disminución significativa del porcentaje de células en esta fase ($p < 0,05$), evidenciando una alteración en la progresión normal del ciclo celular. En la fase S, ni BSY02 ni MMC generaron cambios significativos respecto a las células control ($p > 0,05$). Por el contrario, en la fase G2/M, el tratamiento con MMC produjo un aumento significativo en la proporción de células ($p < 0,05$), compatible con un efecto bloqueante del ciclo celular, mientras que BSY02 no modificó significativamente la distribución celular respecto al grupo control ($p > 0,05$). Estos resultados indican que BSY02 no induce alteraciones detectables en la progresión del ciclo celular de células CHO-K1 el tratamiento con MMC produjo un aumento significativo en la proporción de células ($p < 0,05$), compatible con un efecto bloqueante

del ciclo celular, lo cual es consistente con la falta de citotoxicidad observada en los ensayos de viabilidad previos.

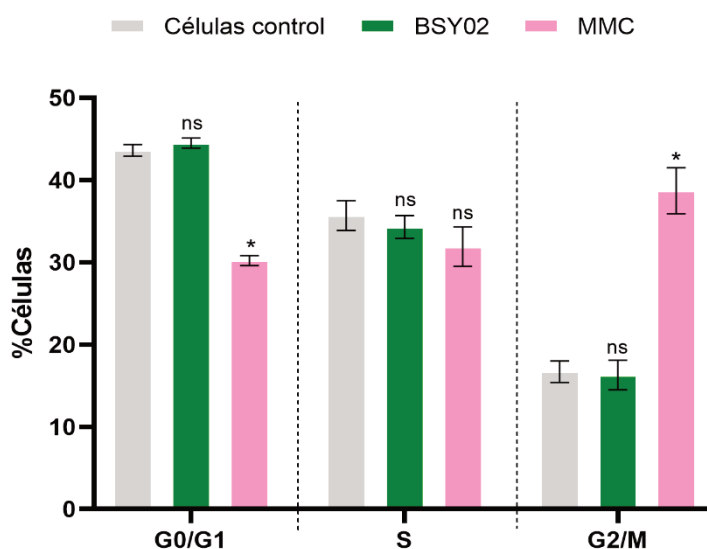


Figura 38. Porcentaje de células CHO-K1 en las distintas fases del ciclo celular (G0/G1, S y G2/M) luego de 48 h de tratamiento con BSY02 (0,34 $\mu\text{g/ml}$), MMC (0,5 $\mu\text{g/ml}$, control positivo) y células control (medio de cultivo). Los porcentajes de células en cada fase se determinaron por citometría de flujo luego de tinción con ioduro de propidio (IP). Los valores se expresan como media $\pm$ desviación estándar. El símbolo (*) indica diferencia significativa respecto al control ($p < 0,05$), ns: diferencias no significativas ($p > 0,05$).

4.2.a.5 Estudio de la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS)

La producción intracelular de ROS se evaluó en células CHO-K1 mediante citometría de flujo, utilizando HE. Como se observa en la Figura 39, el tratamiento de las células CHO-K1 con BSY02 (0,34 $\mu\text{g/ml}$) durante 48 h no generó un aumento significativo en la producción de ROS en comparación con las células control ($p > 0,05$), lo que indica que el tratamiento no induce estrés oxidativo bajo las condiciones experimentales evaluadas. Por el contrario, las células tratadas con DOX (50 $\mu\text{g/ml}$) o H_2O_2 (5%), utilizados como controles positivos, mostraron un incremento significativo en la producción de ROS respecto a las células control ($p < 0,05$).

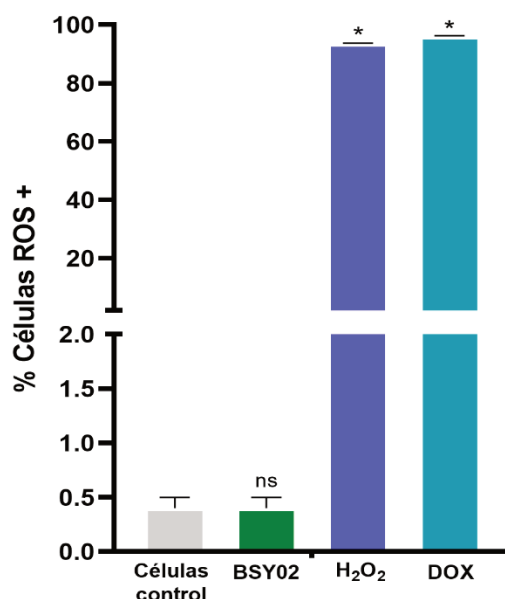


Figura 39. Evaluación de la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) en células CHO-K1 mediante citometría de flujo utilizando hidroetidina (HE). Las células fueron tratadas durante 48 h con BSY02 (0,34 $\mu\text{g/ml}$), H₂O₂ (5% v/v, control positivo de estrés oxidativo) y DOX (50 $\mu\text{g/ml}$, control positivo), y comparadas con células control (sin tratar). Los valores se expresan como media $\pm$ desviación estándar. El símbolo (*) indica diferencias significativas con respecto a las células control ($p < 0,05$), ns: diferencia no significativa ($p > 0,05$).

4.2.a.6 Determinación de γH2AX como biomarcador de roturas de doble cadena de ADN

Se evaluó el porcentaje de células CHO-K1 positivas para γH2AX mediante citometría de flujo, luego de 48 h de tratamiento con BSY02 (0,34 $\mu\text{g/ml}$). Como controles se incluyeron células cultivadas en medio de cultivo (células control) y células tratadas con BLM (100 $\mu\text{g/ml}$), como control positivo de daño genotóxico.

Los resultados obtenidos indicaron que el tratamiento con BSY02 no indujo un incremento significativo en la señal de γH2AX en comparación con las células control ($p > 0,05$), lo que sugiere que el compuesto no provocó roturas de doble cadena en el ADN bajo las condiciones experimentales utilizadas. En contraste, las células tratadas con BLM mostraron un aumento significativo en la señal de γH2AX con respecto al control ($p < 0,05$), confirmando su efecto genotóxico (Figura 40).

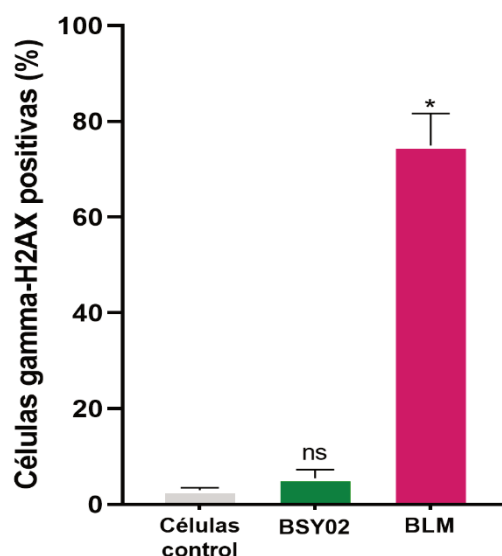


Figura 40. Detección de daño en el ADN mediante cuantificación de γ H2AX en células CHO-K1. Porcentaje de células CHO-K1 positivas para γ H2AX (%) después de 48 h de tratamiento con BSY02 (0,34 μ g/ml) y BLM (100 μ g/ml, control positivo) analizado por citometría de flujo. Los valores se expresan como media $\pm$ desviación estándar. El símbolo (*) indica diferencias significativas respecto al control ($p < 0,05$), ns: diferencia no significativa ($p > 0,05$).

4.2.a.7 Estudio de la frecuencia de micronúcleos en presencia de citocalasina-B

Para evaluar el potencial genotóxico de BSY02, se determinó la frecuencia de MN en células CHO-K1 mediante el ensayo de CBMN.

Como se muestra en la Tabla 7, todas las condiciones experimentales evaluadas, incluyendo el tratamiento con BSY02, los controles positivos (BLM y MMC) y las células control, presentaron valores de CBPI mayores a 1, lo que confirman que las células han proliferado activamente a lo largo del ensayo y no se evidenciaron diferencias significativas ($p > 0,05$) respecto de los valores del control negativo. Estos resultados muestran que el BSY02 no induce alteraciones en la cinética de proliferación celular.

Tabla 7. Índice de proliferación celular en presencia de citocalasina B (CBPI) en células CHO-K1 tratadas con BSY02.

Tratamiento (*)	CBPI (media $\pm$ DE)
Células control	1,95 $\pm$ 0,01
BLM (Control positivo)	1,89 $\pm$ 0,04
MMC (Control positivo)	1,79 $\pm$ 0,04
BSY02	1,73 $\pm$ 0,05

(*) Los valores correspondientes a células control, BLM y MMC son los que se muestran en la Tabla 3, ya que fueron los mismos que se utilizaron en el presente ensayo.

A continuación, se muestran imágenes representativas del ensayo de MN realizado en células CHO-K1, obtenidas tras 48 h de exposición a BSY02 (0,34 μ g/ml), así como a los controles positivos y células control. Las preparaciones, teñidas con Giemsa al 10%, permiten identificar células binucleadas, con y sin MN, utilizadas para el análisis cuantitativo del daño genético (Figura 41).

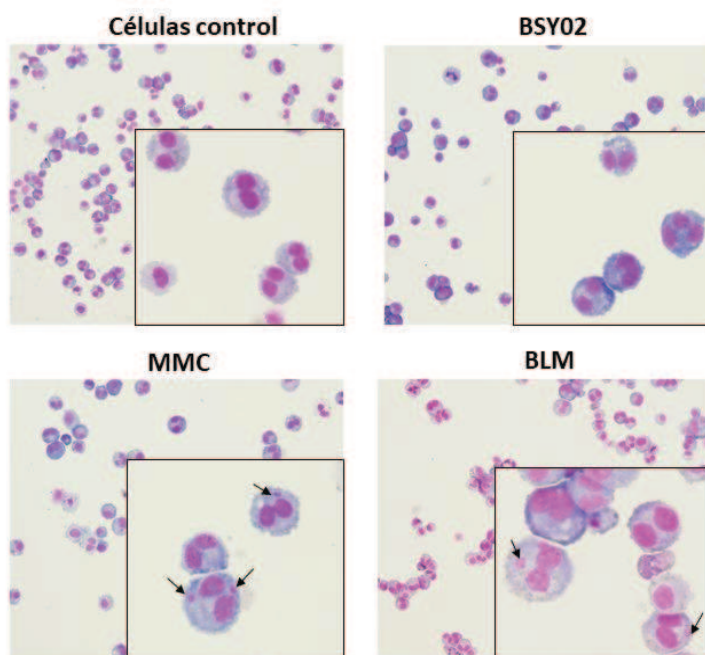


Figura 41. Ensayo de micronúcleos con bloqueo de la citocinesis (CBMN) en células CHO-K1. Imágenes representativas de células binucleadas obtenidas tras 48 h de exposición a los diferentes tratamientos: control, BSY02, mitomicina C (MMC) y bleomicina (BLM). Las preparaciones fueron teñidas con Giemsa al 10% y observadas con un microscopio Zeiss Axioscope 7 con un objetivo de 20X. En los recuadros se muestran ampliaciones donde se destacan células binucleadas con (flechas negras) y sin micronúcleos.

Posteriormente, se determinó la frecuencia de MN en células binucleadas (%MN). Los valores obtenidos fueron 0,9% para las células tratadas con BSY02, 0,8% para las células control, 6,8% para las células tratadas con BLM y 24,3% para las células tratadas con MMC (Figura 42). El análisis estadístico indicó que el tratamiento con BSY02 no produjo un aumento significativo en la frecuencia de MN en comparación con las células control ($p > 0,05$), lo que sugiere ausencia de genotoxicidad detectable en las condiciones experimentales ensayadas. En cambio, ambos controles positivos provocaron un aumento significativo en la frecuencia de MN en comparación con las células control ($p < 0,05$).

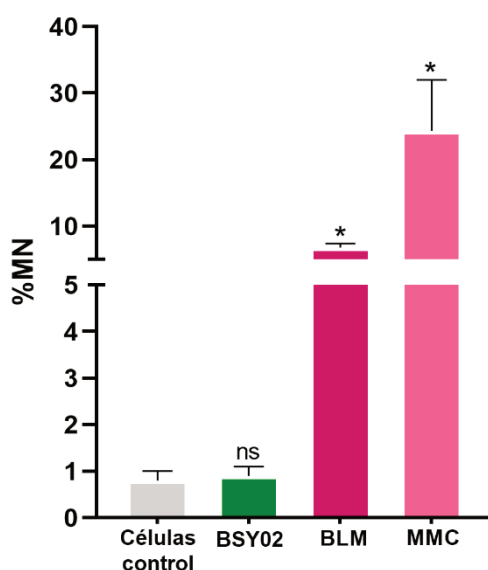


Figura 42. Frecuencia de micronúcleos (%MN) en células CHO-K1 tras 48 h de exposición a BSY02, BLM y MMC. Los resultados se expresan como porcentaje de micronúcleos (%MN) en células binucleadas, representados como media $\pm$ desviación estándar. El símbolo (*) indica diferencias significativas respecto a las células control ($p < 0,05$); ns: diferencias no significativas ($p > 0,05$).

4.2.a.8 Estudio de la inducción de rupturas de cadena simple en el ADN

La evaluación de la inducción de rupturas de cadena simple en el ADN se llevó a cabo mediante el EC en condiciones alcalinas, siguiendo el mismo diseño experimental y criterios de análisis previamente descritos para la línea celular CHO-K1 expuesta al compuesto U-Omp19 (sección 4.1.a.8). Previamente al ensayo, se optimizó la concentración de H_2O_2 utilizada como control positivo de daño genotóxico.

La Figura 43 muestra microfotografías representativas del EC tras el tratamiento de células CHO-K1 durante 48 h con BSY02 (0,34 μ g/ml), BLM (0,5 μ g/ml) y H_2O_2 (100 μ M).

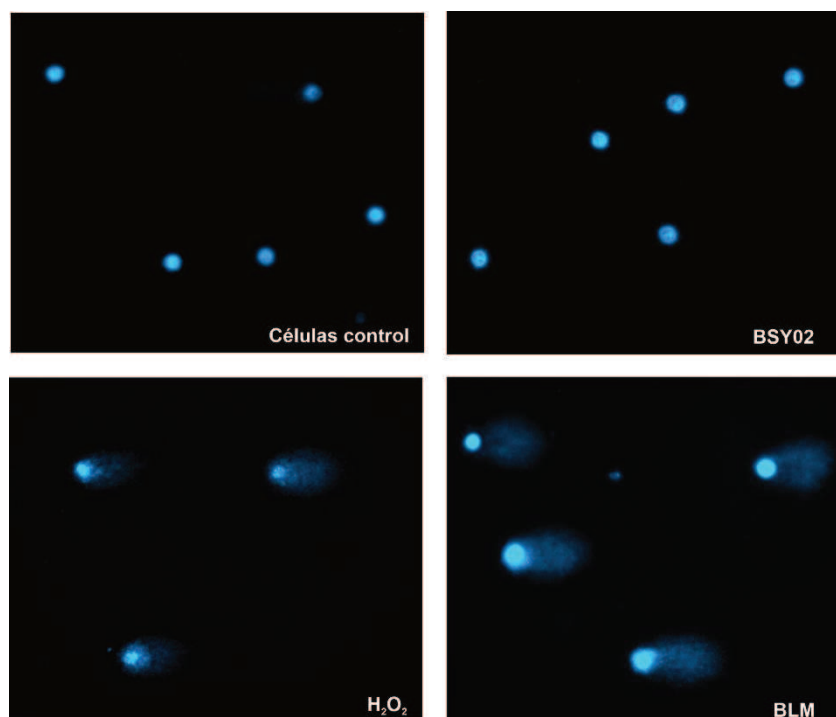


Figura 43. Microfotografías representativas del ensayo cometa en células CHO-K1 tras 48 h de exposición a BSY02, bleomicina (BLM) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Las células fueron teñidas con DAPI observadas mediante microscopía de fluorescencia utilizando el microscopio Zeiss Axio Observer con un objetivo de 20X.

Los resultados indicaron que el tratamiento con BSY02 no indujo un aumento significativo en el daño genético en comparación con las células control ($p > 0,05$), evidenciado por la ausencia de diferencias en el porcentaje de ADN en la cola del cometa. Por el contrario, las células expuestas a H_2O_2 y a BLM (controles positivos) presentaron un incremento significativo en el porcentaje de ADN en la cola en comparación con las células control ($p < 0,05$) (Figura 44).

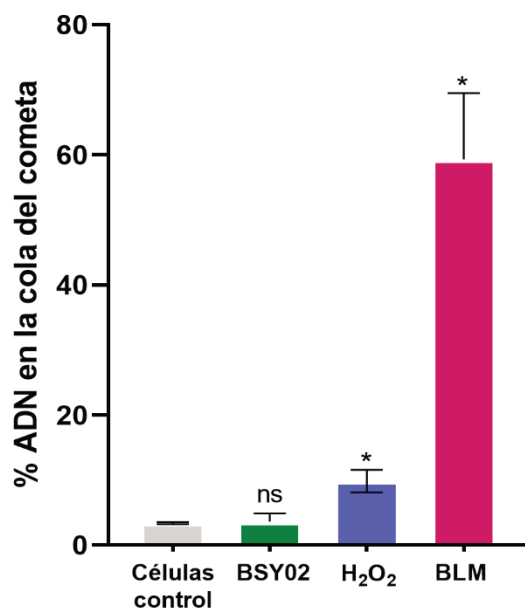


Figura 44. Evaluación del daño en el ADN mediante ensayo cometa en células CHO-K1 tras 48 h de tratamiento con BSY02 (0,34 $\mu\text{g/ml}$), BLM (100 $\mu\text{g/ml}$) durante 48 h, y H₂O₂ (100 μM) durante 15 min. El porcentaje de ADN en la cola se utilizó como parámetro cuantitativo del daño genotóxico. Los resultados se expresan como media $\pm$ desviación estándar. El símbolo (*) indica diferencias significativas en comparación con las células control ($p < 0,05$), ns: diferencia no significativa ($p > 0,05$).

4.2.b Resultados obtenidos en la línea celular A549

4.2.b.1 Estudio de la viabilidad celular mediante el ensayo del MTT

Para evaluar el posible efecto citotóxico de la BSY02 sobre la línea celular A549, se evaluó la viabilidad celular mediante el ensayo de MTT luego de 48 h de exposición a diferentes concentraciones de dicho compuesto. Las concentraciones evaluadas fueron: 0,2, 0,34, 0,5, 0,7, 0,84, 1,68, 4,2, 8,4, 16,8, 84 $\mu\text{g/ml}$; equivalentes a 20, 40, 60, 80, 100, 200, 500, 1000, 2000, 10000UI/ml; respectivamente.

La exposición a BSY02 no produjo alteraciones morfológicas evidentes en las células A459, tal como se observa en las microfotografías representativas de la Figura 45.

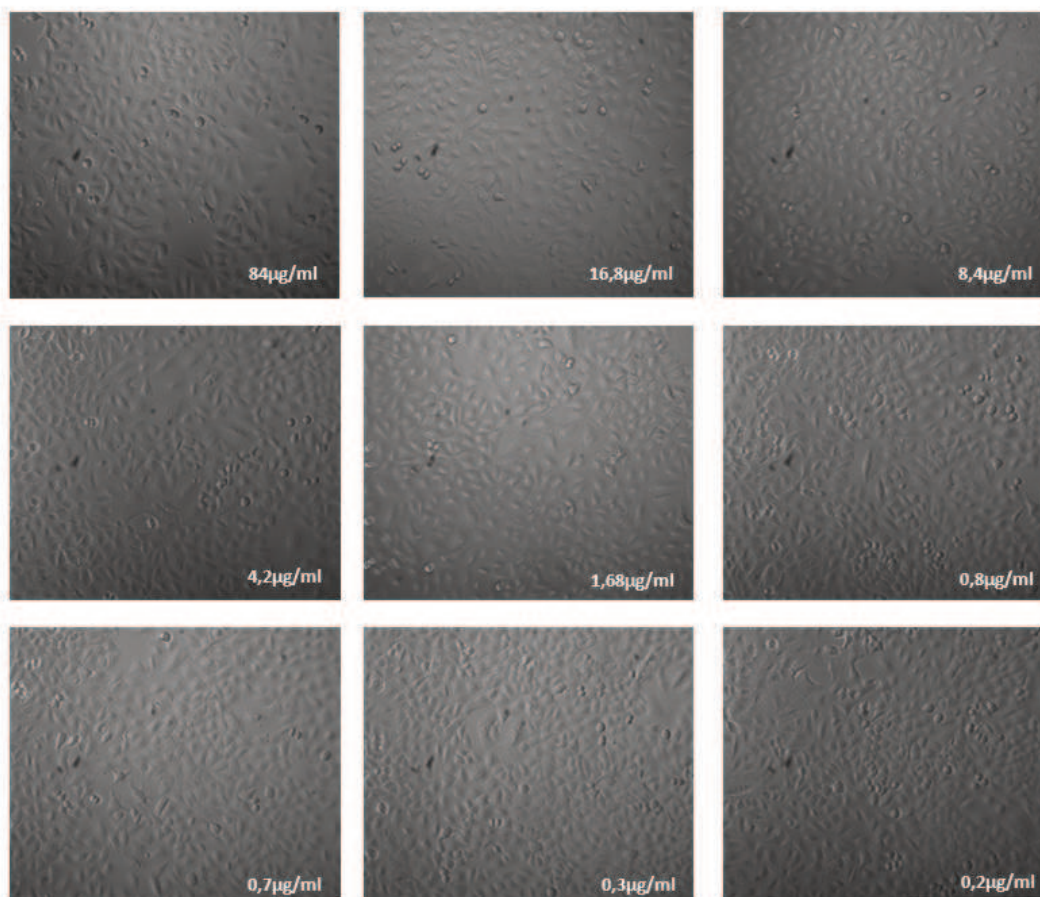


Figura 45. Microfotografías representativas de células A549 luego de 48 h de exposición a diferentes concentraciones de BSY02 obtenidas utilizando un microscopio Zeiss Axio Observer con un objetivo de 10X.

Los resultados del ensayo de MTT demostraron que BSY02 no indujo citotoxicidad en la línea celular A549, dado que el porcentaje de viabilidad celular se mantuvo por encima del 70% en todas las concentraciones analizadas. En contraste, los agentes utilizados como controles positivos: DOX (0,5, 1, 5, 10, 25, 50, 100, 200 $\mu\text{g/ml}$), MMC (0,5, 1, 10,

25, 50, 100, 200 $\mu\text{g/ml}$) y BLM (0,25, 0,5, 1, 5, 10, 25, 50, 100, 200 $\mu\text{g/ml}$), generaron una disminución progresiva y dependiente de la concentración en la viabilidad celular de A549 (DOX: $r = -0,91$; MMC: $r = -0,98$, BLM: $r = -0,56$) (Figura 46).

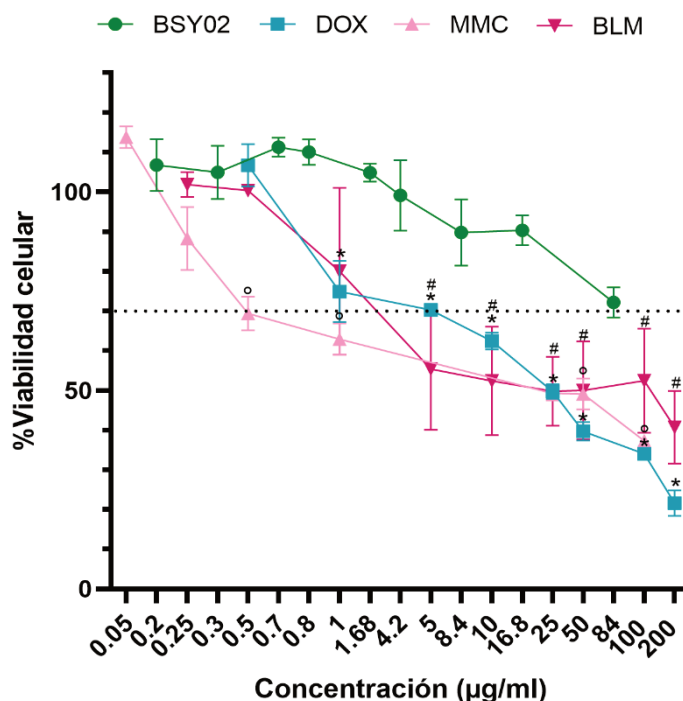


Figura 46. Evaluación de la viabilidad celular de células A549 tras 48 h de exposición a BSY02, DOX, MMC y BLM mediante el ensayo de MTT. Los datos se expresan como porcentaje de viabilidad celular respecto al control sin tratamiento (100%), representados como la media $\pm$ desviación estándar, de al menos tres experimentos independientes. La línea punteada indica el umbral del 70% de viabilidad celular, establecido por ISO 10993-5:2009 como valor de referencia para indicar potencial citotóxico. El símbolo (*), (#) y (°), indica diferencia significativa ($p < 0,05$) respecto al control negativo, correspondiendo (*) a DOX, (#) a MMC y (°) a BLM.

En concordancia con los resultados obtenidos en la línea celular CHO-K1, y considerando la ausencia de efectos citotóxicos en A549, se seleccionó la concentración de 0,34 $\mu\text{g/ml}$ (40 UI/ml) como concentración representativa para la realización de los estudios funcionales posteriores.

4.2.b.2 Estudio de la de muerte celular por apoptosis/necrosis

Con el objetivo de determinar si el tratamiento con BSY02 induce muerte celular programada en la línea celular A549, se analizó el perfil apoptótico mediante citometría de flujo. Para ello, se compararon células A549 tratadas con BSY02 con células en medio de cultivo sin tratamiento (células control), utilizando DOX y H_2O_2 como controles positivos.

El análisis se realizó utilizando el kit de detección Anexina V-FITC/PI Tal como se muestra en la Figura 47, las células control presentaron un alto porcentaje de células viables (~94%) acompañado de una baja proporción de células apoptóticas (<5%) y necróticas (~ 0,8%), o que refleja un bajo nivel basal de muerte celular en condiciones fisiológicas. El tratamiento con BSY02 no provocó cambios significativos en la distribución de las poblaciones celulares en comparación con las células control ($p>0,05$), sin evidenciar incrementos en apoptosis temprana, apoptosis tardía ni necrosis. Estos resultados indican que BSY02 no induce muerte celular programada ni necrosis en células A549 bajo las condiciones experimentales evaluadas. En contraste, las células tratadas con DOX y el H_2O_2 mostraron un aumento significativo en los porcentajes de células en apoptosis y necrosis, respecto a las células control ($p<0,05$).

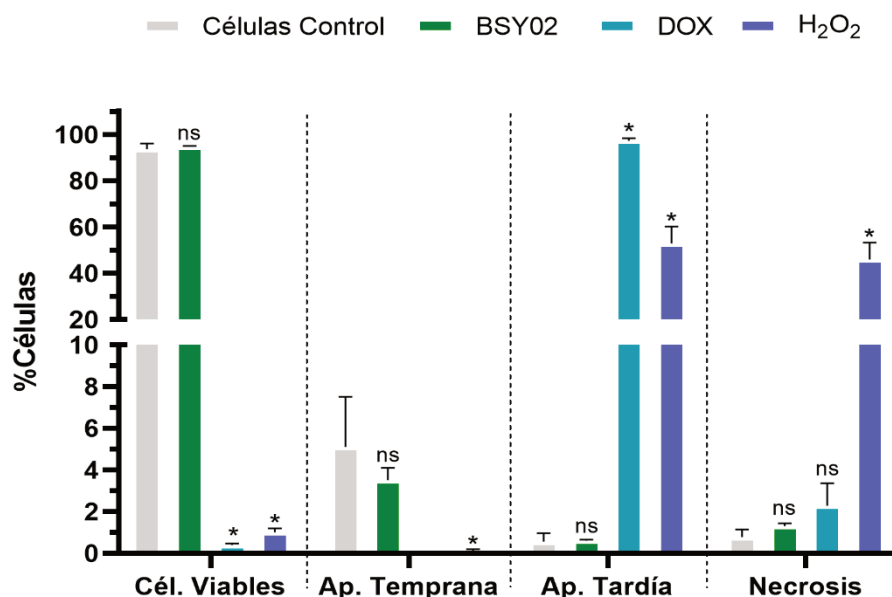


Figura 47. Evaluación del efecto de BSY02 sobre la muerte celular por apoptosis/necrosis en células A549. Las células fueron incubadas durante 48 h con BSY02 (0,34 $\mu\text{g/ml}$) y posteriormente analizadas por citometría de flujo mediante tinción con Anexina V-FITC/PI. Las barras representan los porcentajes de células viables, en apoptosis temprana (Ap. Temprana), en apoptosis tardía (Ap. Tardía) y en necrosis. Las células control se cultivaron en medio DMEM-F12-SFB, mientras que DOX y H_2O_2 se utilizaron como controles positivos de apoptosis. Los valores se expresan como media $\pm$ desviación estándar. El símbolo (*) indica diferencia significativa ($p<0,05$) respecto a las células control; ns: diferencia no significativa ($p>0,05$).

4.2.b.3 Evaluación de la activación de la caspasa-3

Se analizó la actividad de caspasa-3 activa en células A549 expuestas durante 48 h a BSY02 (0,34 $\mu\text{g/ml}$). Los resultados obtenidos mostraron que el tratamiento con BSY02 no produjo un aumento significativo en el porcentaje de células positivas para caspasa-3 activa en comparación con las células control ($p>0,05$). Por el contrario, las células

tratadas con DOX (50 $\mu\text{g/ml}$), utilizada como control positivo, evidenciaron un incremento significativo en la actividad de caspasa-3 escindida con respecto a las células control ($p>0,05$) (Figura 48).

Estos resultados son consistentes con los obtenidos previamente en el ensayo de apoptosis/necrosis mediante tinción con Anexina V-FITC/PI, donde el tratamiento con BSY02 no produjo un aumento significativo de las poblaciones celulares en apoptosis temprana o tardía, reforzando la evidencia de que BSY02 no induce apoptosis en células A549 bajo las condiciones experimentales evaluadas.

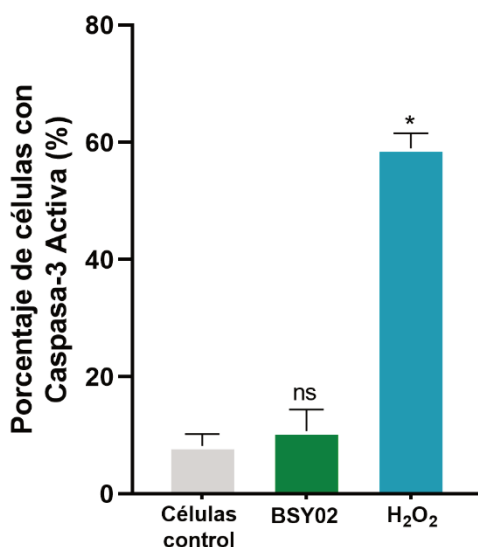


Figura 48. Evaluación de caspasa-3 escindida en células A549 tratadas con BSY02. Las células A549 fueron incubadas durante 48 h con BSY02 (0,34 $\mu\text{g/ml}$), DOX (50 $\mu\text{g/ml}$; control positivo) o medio DMEM-F12-SFB (células control, sin tratamiento). La cantidad de caspasa-3 escindida se determinó por citometría de flujo. Los resultados se presentan como media $\pm$ desviación estándar del porcentaje de células con caspasa-3 activa respecto a las células control. El símbolo (*) indica diferencias significativas respecto a las células control ($p<0,05$), ns: diferencia no significativa ($p>0,05$).

4.2.b.4 Estudio de la progresión del ciclo celular

La distribución de las células A549 en las distintas fases del ciclo celular (G0/G1, S y G2/M) se analizó mediante citometría de flujo utilizando tinción con IP, luego de 48 h de exposición a BSY02 (0,34 $\mu\text{g/ml}$). Se incluyeron como controles células sin tratar (células control) y células tratadas con MMC (0,05 $\mu\text{g/ml}$) como control positivo. En la Figura 49 se muestran los histogramas representativos de la distribución de las fases G0/G1, S y G2/M en cada condición experimental.

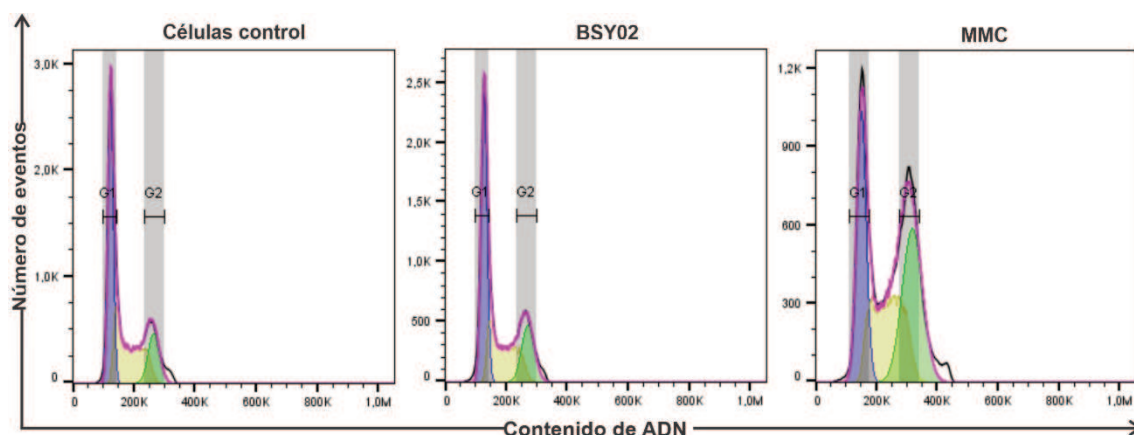


Figura 49. Histogramas representativos del análisis del ciclo celular en células A549 tras 48 h de tratamiento. Se muestran los perfiles de distribución del contenido de ADN correspondientes a células control (sin tratar), tratadas con BSY02 (0,34 $\mu\text{g/ml}$) y con MMC (0,5 $\mu\text{g/ml}$, control positivo). Las regiones sombreadas indican las fases G0/G1 y G2/M del ciclo celular, determinadas según el contenido de ADN medido mediante tinción con ioduro de propidio (IP).

En la Figura 50 se presenta el análisis cuantitativo de los porcentajes de células en cada fase del ciclo celular. El tratamiento con BSY02 no produjo diferencias significativas en la proporción de células en fase G0/G1 respecto a las células control ($p > 0,05$). En cambio, las células tratadas con MMC mostraron una disminución significativa del porcentaje de células en esta fase ($p < 0,05$), evidenciando una alteración en la progresión normal del ciclo celular. En cuanto a la fase S, ninguno de los tratamientos evaluados, incluyendo BSY02 y MMC, mostró diferencias significativas respecto al control ($p > 0,05$). Por último, en la fase G2/M, el tratamiento con BSY02 no modificó de forma significativa la distribución celular en comparación a las células control ($p > 0,05$), mientras que MMC provocó un aumento significativo en el porcentaje de células en esta fase ($p < 0,05$), sugiriendo un posible bloqueo en G2/M asociado a su efecto citotóxico.

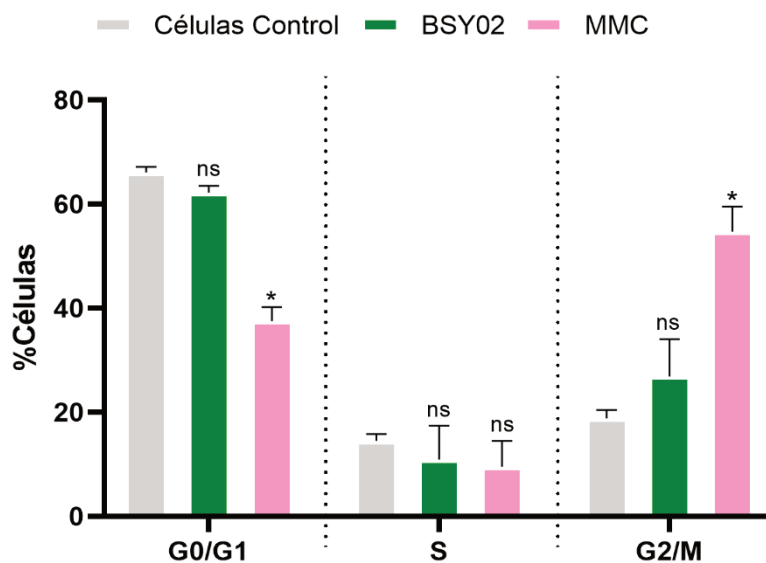


Figura 50. Porcentaje de células A549 en las distintas fases del ciclo celular (G0/G1, S y G2/M) luego de 48 h de tratamiento con BSY02 (0,34 $\mu\text{g/ml}$), MMC (0,05 $\mu\text{g/ml}$, control positivo) y células control (medio de cultivo). Los porcentajes de células en cada fase se determinaron por citometría de flujo luego de la tinción con ioduro de propidio (IP). Los valores se expresan como media $\pm$ desviación estándar. El símbolo (*) indica diferencia significativa respecto al control ($p < 0,05$), ns: diferencias no significativas ($p > 0,05$).

Estos resultados indican que BSY02 no induce alteraciones detectables en la progresión del ciclo celular de células A549 bajo las condiciones experimentales evaluadas, lo cual es consistente con la ausencia de citotoxicidad observada previamente en los ensayos de viabilidad celular.

4.2.b.5 Estudio de la producción de especies reactivas del oxígeno

La producción de ROS en células A549 fue evaluada mediante citometría de flujo tras 48 h de tratamiento con BSY02 (0,34 $\mu\text{g/ml}$). Asimismo, se incluyeron células sin tratar (células control) y células tratadas con DOX (50 $\mu\text{g/ml}$) y H_2O_2 (5% v/v) como controles positivos.

Como se observa en la Figura 51, el tratamiento con BSY02 no generó ni produjo un aumento significativo en el porcentaje de células positivas para ROS en comparación con células control ($p > 0,05$), lo que indica que el compuesto no induce estrés oxidativo en la línea celular A549 bajo las condiciones experimentales evaluadas. Por el contrario, los tratamientos con DOX y H_2O_2 provocaron un incremento significativo en la producción de ROS en comparación con las células control ($p < 0,05$).

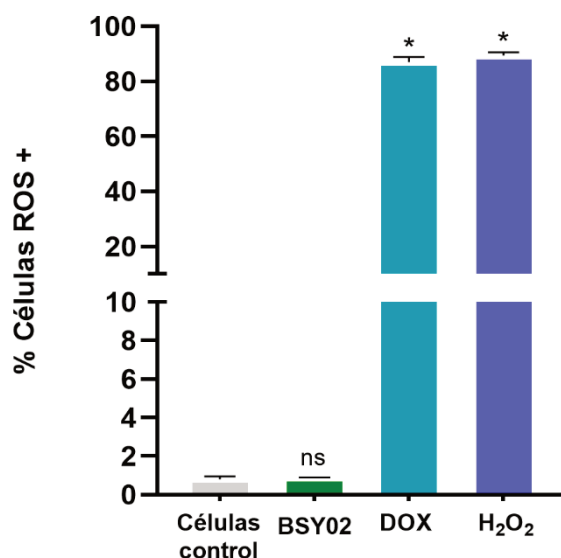


Figura 51. Evaluación de la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) en células A549 mediante citometría de flujo utilizando hidroetidina (HE). Las células fueron tratadas durante 48 h con BSY02 (0,34 $\mu\text{g/ml}$), H₂O₂ (5% v/v, control positivo de estrés oxidativo) y DOX (50 $\mu\text{g/ml}$, control positivo), y comparadas con células control (sin tratar). Los valores se expresan como media $\pm$ desviación estándar. El símbolo (*) indica diferencias significativas con respecto a las células control ($p < 0,05$), ns: diferencia no significativa ($p > 0,05$).

4.2.b.6 Determinación de γH2AX como biomarcador de roturas de doble cadena de ADN

La inducción de roturas de doble cadena en el ADN fue evaluada mediante la determinación de la fosforilación de la histona γH2AX por citometría de flujo en células A549. Para ello, las células fueron tratadas durante 48 h con BSY02 (0,34 $\mu\text{g/ml}$) y comparadas con células control (sin tratamiento) y con células tratadas con bleomicina (BLM, 100 $\mu\text{g/ml}$), utilizada como control positivo de genotoxicidad.

Los resultados mostraron que el tratamiento con BSY02 no produjo un aumento significativo en el porcentaje de células γH2AX positivas en comparación con las células control ($p > 0,05$), lo que indica que, bajo las condiciones experimentales empleadas, BSY02 no induce daño en el ADN de doble cadena en la línea celular A549. Por el

contrario, las células tratadas con BLM mostraron un incremento significativo en el porcentaje de γ H2AX en comparación con las células control ($p < 0,05$) (Figura 52).

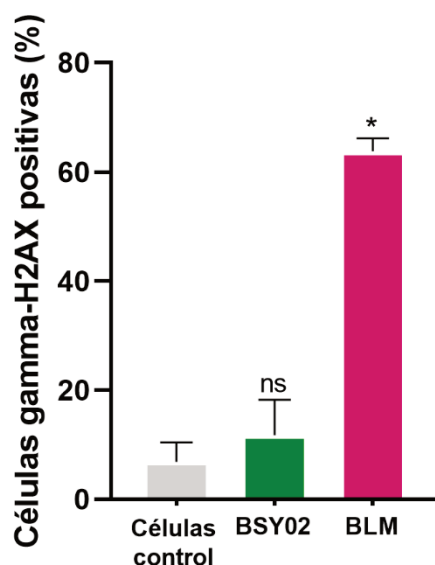


Figura 52. Detección de daño en el ADN mediante cuantificación de la histona γ H2AX en células A549. Porcentaje de células A549 positivas para γ H2AX (%) después de 48 h de tratamiento con BSY02 (0,34 μ g/ml) y BLM (100 μ g/ml, control positivo) analizado por citometría de flujo. Los valores se expresan como media $\pm$ desviación estándar. El símbolo (*) indica diferencias significativas respecto al control ($p < 0,05$), ns: diferencia no significativa ($p > 0,05$).

4.2.b.7 Estudio de la frecuencia de MN en presencia de citocalasina-B

Con el fin de evaluar el potencial genotóxico de BSY02 en la línea celular A549, se determinó la frecuencia de MN mediante el ensayo de CBMN. Previo al análisis de la frecuencia de MN, se determinó el CBPI a partir del recuento de células mononucleadas, binucleadas y multinucleadas.

En el presente ensayo, el CBPI fue determinado únicamente para las células tratadas con BSY02, mientras que los valores correspondientes a las células control y al control positivo (BLM) se tomaron del ensayo CBMN previamente realizado para el compuesto U-Omp19, dado que no se repitió la evaluación de dichos controles y se mantuvieron constantes las condiciones experimentales (sección 4.1.b.7).

En el caso de las células tratadas con BSY02, se obtuvo un valor de CBPI de $1,85 \pm 0,02$, indicando que el tratamiento no afectó la capacidad proliferativa de la línea celular A549 durante el período de exposición ensayado. Asimismo, los valores previamente obtenidos para las células control y el control positivo confirmaron un comportamiento proliferativo comparable, permitiendo la correcta interpretación de los resultados de genotoxicidad. No se evidenció diferencias significativas ($p > 0,05$) respecto de los

valores del control negativo. Estos resultados muestran que el BSY02 no induce alteraciones en la cinética de proliferación celular.

A continuación, se muestran microfotografías representativas del ensayo de MN en células A549, luego de 48 h de exposición a BSY02, a BLM (control positivo) y de las células control (Figura 53). En las imágenes se observan células binucleadas con y sin micronúcleos, utilizadas para el análisis cuantitativo del daño genético.

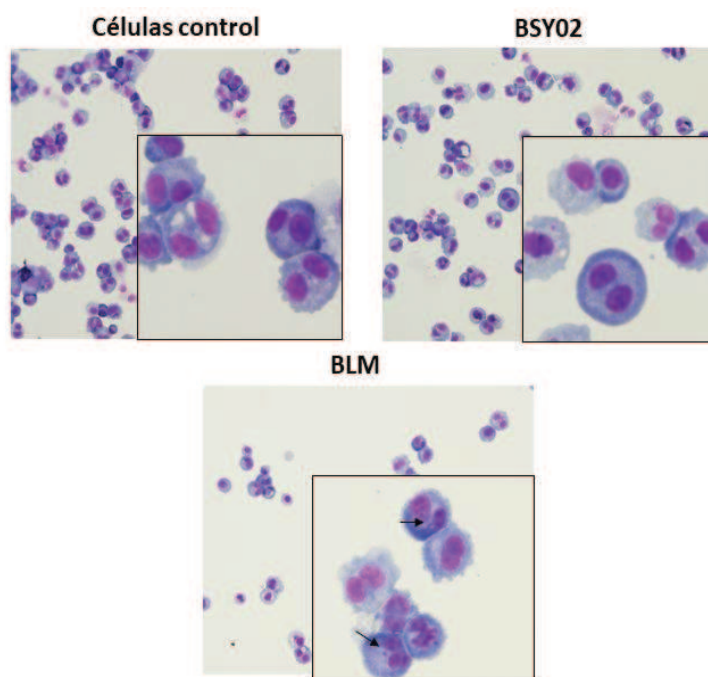


Figura 53. Ensayo de micronúcleos con bloqueo de la citocinesis (CBMN) en células A549. Imágenes representativas de células binucleadas obtenidas tras 48 h de exposición a los diferentes tratamientos: control, BSY02 y bleomicina (BLM). Las preparaciones fueron teñidas con Giemsa al 10% y observadas con un microscopio Zeiss Axioscope 7 con un objetivo de 20X. En los recuadros se muestran ampliaciones donde se destacan células binucleadas con (flechas negras) y sin micronúcleos.

Posteriormente, se determinó la frecuencia de MN en células binucleadas (%MN). Los valores obtenidos fueron del 1,6% para células tratadas con BSY02, 1,4% para las células control, y 7,3% para las células tratadas con BLM (Figura 54). El tratamiento con BSY02 no mostró diferencias significativas en la frecuencia de MN respecto a las células control ($p > 0,05$). En cambio, las células tratadas con BLM presentaron un aumento significativo en el %MN respecto a las células control ($p < 0,05$).

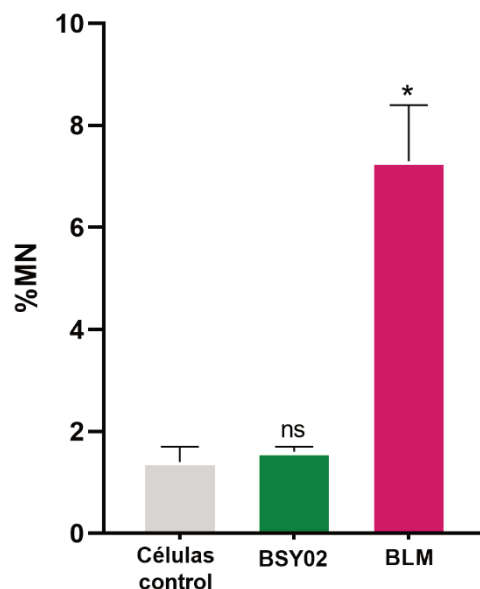


Figura 54. Frecuencia de micronúcleos (%MN) en células A549 tras 48 h de exposición a BSY02 y BLM. Los resultados se expresan como porcentaje de micronúcleos (%MN) en células binucleadas, representados como media $\pm$ desviación estándar. El símbolo (*) indica diferencias significativas respecto a las células control ($p < 0,05$); ns: diferencias no significativas ($p > 0,05$).

4.2.b.8 Estudio de la inducción de rupturas de cadena simple en el ADN

La concentración de H_2O_2 utilizada como control positivo fue previamente optimizada, tal como se describió en el apartado 4.1.b.8. En la Figura 55 se muestran microfotografías representativas del EC en condiciones alcalinas en células A549 tras 48 h de exposición a BSY02 (0,34 $\mu g/ml$), así como tras el tratamiento con H_2O_2 (100 μM).

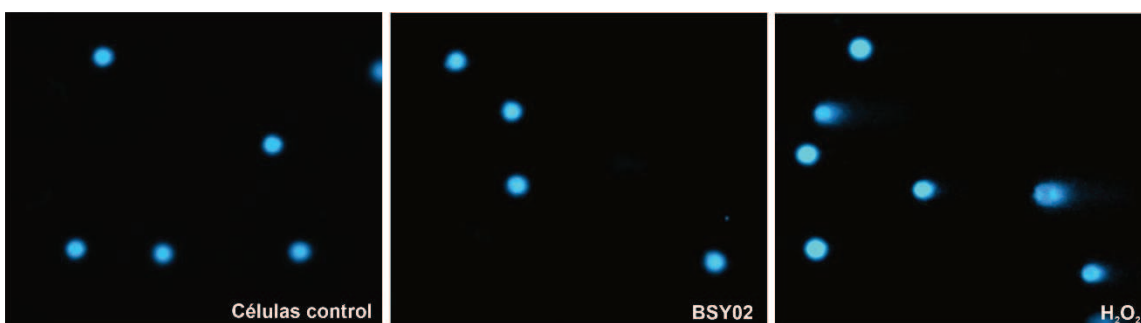


Figura 55. Microfotografías representativas del ensayo cometa en células A549 tras 48 h de exposición a BSY02 y peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Las células fueron teñidas con DAPI observadas mediante microscopía de fluorescencia utilizando el microscopio Zeiss Axio Observer con un objetivo de 20X.

El análisis cuantitativo del daño genético reveló que el tratamiento con BSY02 no induce roturas de cadena simple del ADN en la línea celular A549 a la concentración evaluada, ya que el porcentaje de ADN en la cola del cometa fue comparable al observado en las células control ($p>0,05$). Por el contrario, la exposición de las células a H_2O_2 generó un aumento significativo en el porcentaje de ADN en la cola del cometa, en comparación con las células control ($p<0,05$) (Figura 56)

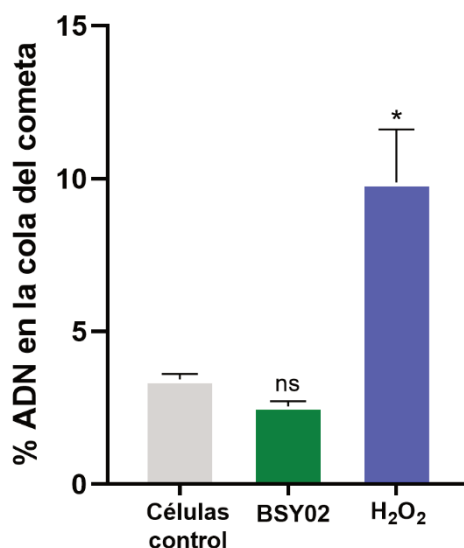
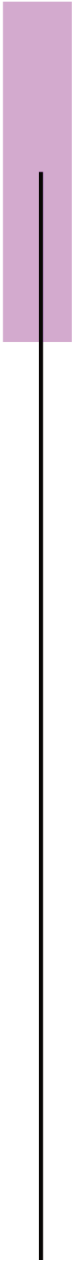
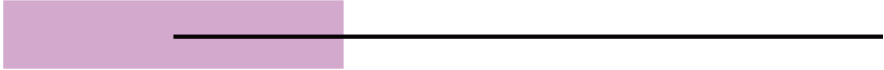


Figura 56. Evaluación del daño en el ADN mediante ensayo cometa en células A549 luego del tratamiento con BSY02 (0,34 $\mu\text{g/ml}$) durante 48 h, y H_2O_2 (100 μM) durante 15 min. El porcentaje de ADN en la cola se utilizó como parámetro cuantitativo del daño genotóxico. Los resultados se expresan como media $\pm$ desviación estándar. El símbolo (*) indica diferencias significativas en comparación con las células control ($p<0,05$), ns: diferencia no significativa ($p>0,05$).



5. DISCUSIÓN

En los últimos años, la evaluación preclínica de nuevos compuestos ha avanzado hacia la incorporación de modelos experimentales que reducen o reemplazan el uso de animales de experimentación, conocidos como métodos alternativos. Este cambio responde no solo a consideraciones éticas, sino también a fundamentos científicos y regulatorios vinculados con la necesidad de desarrollar estrategias más reproducibles, mecanísticas y predictivas. En este marco, los métodos alternativos se encuentran alineados con el principio de las 3R, que promueve la reducción del número de animales empleados, el refinamiento de los procedimientos experimentales para minimizar el sufrimiento y, siempre que sea posible, el reemplazo de los modelos animales por sistemas no animales, tales como sistemas *in vitro*, *ex vivo* o *in silico* (Russell & Burch, 1959).

Diversos análisis críticos han puesto en evidencia que, si bien los ensayos con animales continúan siendo una práctica habitual en la investigación farmacéutica e industrial para predecir la toxicidad en humanos, su capacidad predictiva presenta limitaciones. Las diferencias fisiológicas, metabólicas, inmunológicas y moleculares entre especies pueden hacer que determinados modelos animales no reflejen adecuadamente la respuesta humana, lo que puede traducirse en retrasos en el desarrollo de nuevos fármacos, costos económicos elevados e, incluso, en la exclusión temprana de compuestos con potencial terapéutico. Además, existen antecedentes documentados de fármacos que fueron considerados seguros en etapas preclínicas, pero que posteriormente generaron efectos adversos graves en ensayos en humanos (Fröhlich, 2018; Van Norman, 2019; Greek & Kramer, 2019). Un caso paradigmático es el de la talidomida, cuyos efectos teratogénicos pusieron de manifiesto profundas limitaciones en la extrapolación interespecie. En particular, se ha descrito que algunos modelos animales, especialmente los roedores, presentan menor sensibilidad a los efectos teratogénicos de la talidomida en comparación con otras especies, como conejos y primates no humanos, mientras que en humanos su administración durante el embarazo ocasionó malformaciones congénitas severas (McBride, 1961; Lenz, 1962; Vargesson, 2015). De manera similar, el anticuerpo monoclonal TGN1412, un superagonista de CD28, fue evaluado en estudios preclínicos sin que se anticipara adecuadamente la magnitud de la respuesta adversa observada posteriormente en humanos. Durante un ensayo clínico de fase I en voluntarios sanos, la administración de TGN1412 desencadenó una reacción inflamatoria sistémica grave, mediada por una liberación masiva de citoquinas, que produjo un cuadro potencialmente fatal (Suntharalingam et al., 2006; Stebbings et al., 2007). Este episodio impulsó una revisión crítica de los

modelos preclínicos utilizados para moléculas inmunomoduladoras y contribuyó al establecimiento de criterios más estrictos para la identificación y mitigación de riesgos en estudios de primera administración en humanos, especialmente para moléculas consideradas de alto riesgo. Otro ejemplo relevante es el de fialuridina, un análogo nucleósido desarrollado para el tratamiento de la hepatitis B. Este compuesto no mostró toxicidad significativa en estudios preclínicos, pero posteriormente indujo insuficiencia hepática grave, acidosis láctica en pacientes y desenlace fatal en varios pacientes durante su evaluación clínica. Estos efectos fueron atribuidos, al menos en parte, a mecanismos de toxicidad mitocondrial que no fueron adecuadamente predichos en los modelos animales utilizados (McKenzie et al., 1995; Lewis et al., 2003). En conjunto, estos antecedentes ilustran que la ausencia de toxicidad en modelos animales no garantiza necesariamente la seguridad en humanos. Por el contrario, ponen de manifiesto la necesidad de incorporar metodologías alternativas y complementarias, particularmente modelos *in vitro*, capaces de aportar información mecanística temprana y de detectar efectos tóxicos relevantes para la especie humana (Leist et al., 2008; Hartung, 2009).

En este sentido, los modelos *in vitro* basados en células humanas representan herramientas de gran valor para la evaluación preclínica ya que permiten estudiar respuestas celulares específicas en un contexto biológico más próximo al humano. Sin embargo, su utilización exclusiva tampoco está exenta de limitaciones. Muchas líneas celulares humanas presentan alteraciones derivadas de su proceso de inmortalización o adaptación al cultivo, incluyendo modificaciones en su capacidad metabólica, pérdida parcial de funciones diferenciadas y ausencia de la complejidad estructural, vascular e inmunológica y tisular propia de un organismo completo (Leist et al., 2008; Hartung, 2009). Por este motivo, el empleo de modelos celulares de distintas especies, incluyendo líneas no humanas, puede aportar información complementaria valiosa. Estas líneas permiten estudiar mecanismos generales de daño celular, como estrés oxidativo, genotoxicidad, alteraciones del ciclo celular, muerte celular o disfunción mitocondrial, procesos que se encuentran ampliamente conservados entre especies (Klaunig et al., 2010). Por lo tanto, el enfoque actual en toxicología preclínica no se orienta necesariamente hacia la sustitución absoluta de un modelo por otro, sino hacia la construcción de estrategias integradoras que combinen diferentes sistemas experimentales. La articulación de modelos *in vitro* humanos y no humanos, sistemas *ex vivo*, herramientas *in silico* y estudios *in vivo* cuidadosamente justificados permite obtener una caracterización más completa del perfil de seguridad de nuevos

compuestos, aumentando la solidez de la interpretación y reduciendo la dependencia exclusiva de modelos animales.

Estas limitaciones han impulsado un cuestionamiento creciente sobre el valor predictivo de la experimentación animal cuando se utiliza como único criterio para anticipar la seguridad en humanos. Desde una perspectiva conceptual, se ha argumentado que tanto los animales como los seres humanos constituyen sistemas biológicos complejos, dinámicos y aún no completamente comprendidos. En este marco, asumir que la ausencia de toxicidad observada en una especie permite predecir de forma confiable la inocuidad en otra puede resultar científicamente insuficiente, incluso cuando los protocolos experimentales sean rigurosos, controlados y estandarizados (Fröhlich, 2018; Greek & Kramer, 2019; Van Norman, 2019) .

En este escenario, la tecnología de cultivo celular ha adquirido un rol central como herramienta clave para reemplazar o complementar el uso de animales de experimentación. Los sistemas *in vitro* permiten realizar estudios más rápidos, reproducibles y de menor costo, bajo condiciones experimentales altamente controladas. Estas características favorecen la detección temprana de efectos tempranos citotóxicos y genotóxicos, así como el análisis de mecanismos celulares específicos involucrados en la respuesta frente a compuestos bioactivos (Andrighetti-Fröhner et al., 2006; Osawke, 2016).

Si bien en Argentina la incorporación de normativas orientadas a limitar la experimentación con animales ha sido más lenta en comparación con otros países, en los últimos años se han observado avances regulatorios importantes. Organismos como el Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA), responsable del registro de agroquímicos, como la Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Productos Sanitarios (ANMAT), encargada de la regulación de medicamentos, cosméticos, productos médicos y productos de uso doméstico, han manifestado un interés creciente en considerar evidencia toxicológica obtenida mediante métodos alternativos validados (Benedetti et al., 2025).

La necesidad de generar información más robusta, predictiva y alineada con los lineamientos regulatorios nacionales e internacionales ha puesto de manifiesto la importancia de incorporar ensayos complementarios orientados al estudio de mecanismos de muerte celular, estrés oxidativo, alteraciones del ciclo celular y daño genético. Estos enfoques permiten aportar evidencia toxicológica de mayor valor traslacional y contribuyen a una interpretación más integral del perfil de seguridad de nuevos compuestos. En este marco, y con el objetivo de ampliar la capacidad predictiva y mecanística de los estudios preclínicos, en el presente trabajo de Tesis Doctoral se

implementaron metodologías destinadas a la evaluación *in vitro* de citotoxicidad y genotoxicidad de nuevos compuestos. La estrategia metodológica desarrollada integró ensayos funcionales y moleculares en líneas celulares de mamíferos. Para el análisis de citotoxicidad se incluyeron ensayos de viabilidad celular mediante MTT, detección de apoptosis/necrosis mediante Anexina V/PI, activación de caspasa-3, producción de ROS y análisis de la progresión del ciclo celular. En cuanto a la evaluación de genotoxicidad, se aplicaron metodologías complementarias como la cuantificación de la histona γ H2AX, el ensayo de MN y el EC.

Tal como señalan Corvi & Madia (2017), la evaluación de la genotoxicidad constituye un componente esencial dentro de la caracterización integral del perfil de seguridad de sustancias químicas y biológicas. En concordancia con este enfoque, las metodologías empleadas en esta Tesis Doctoral fueron seleccionadas considerando los lineamientos establecidos por la OECD, particularmente la guía OECD TG 487 para el ensayo de micronúcleos *in vitro* (OECD TG487, 2023), y por la ICH, mediante la guía ICH S2(R1), así como recomendaciones provenientes de publicaciones científicas internacionales. Particularmente, se utilizaron dos líneas celulares, CHO-K1 y A549, provenientes de distintas especies, con el objetivo de realizar una evaluación preclínica *in vitro* complementaria. La selección de estos modelos celulares permitió integrar una línea de origen no humano ampliamente utilizada en estudios de toxicología genética, como CHO-K1, y una línea humana epitelial, como A549. Esta estrategia resulta consistente con el uso de sistemas celulares de mamífero recomendados para ensayos de genotoxicidad *in vitro*, y aporta información comparativa sobre la respuesta de los compuestos evaluados en modelos celulares de diferente origen biológico.

El ensayo MTT, ampliamente utilizado para la evaluación de citotoxicidad *in vitro*, permite identificar potencial citotóxico a partir de la reducción de la viabilidad celular respecto del control sin tratamiento. De acuerdo con la norma ISO 10993-5:2009(E), una reducción de la viabilidad celular por debajo del 70 % se considera indicativa de potencial efecto citotóxico en el contexto de la evaluación biológica de dispositivos médicos o extractos. En concordancia con antecedentes de nuestro grupo de trabajo, en los cuales esta metodología ha sido utilizada de manera sistemática para evaluar los efectos tóxicos de fármacos, nanocomplejos y extractos vegetales en distintas líneas celulares (Ferrado et al., 2020; Visentini et al., 2020; Ribas et al., 2021; Ribas et al., 2023; Ferrado et al., 2023; Oggero et al., 2023), en la presente Tesis Doctoral el ensayo de MTT se utilizó como herramienta confiable de cribado inicial para establecer concentraciones no citotóxicas y orientar la selección de condiciones experimentales para los ensayos posteriores.

No obstante, si bien el MTT constituye una metodología robusta, sencilla y reproducible, su interpretación requiere considerar ciertas limitaciones. Este ensayo no determina de manera directa la viabilidad celular, sino la actividad metabólica reductora asociada principalmente células metabólicamente activas. Por otro lado, modificaciones en el metabolismo celular, aun sin muerte celular efectiva, pueden conducir a sobreestimaciones o subestimaciones de la viabilidad. Asimismo, se ha descrito que el producto de reducción del MTT, el formazán, puede localizarse tanto en compartimentos intracelulares como extracelulares. En este último caso, parte del producto formado podría perderse durante las etapas de lavado, introduciendo sesgos en la cuantificación. En este sentido, Ghasemi et al. (2021) evidenciaron que el lavado de las células previo a la solubilización del formazán puede reducir significativamente la densidad óptica, constituyéndose como una fuente potencial de variabilidad experimental. Adicionalmente, factores como cambios en el estado redox celular, la producción de ROS o la liberación de componentes intracelulares pueden contribuir a la reducción del MTT de manera independiente de la viabilidad celular estricta, reforzando la necesidad de interpretar este ensayo en conjunto con metodologías adicionales (Ghasemi et al., 2021). Por este motivo, en esta Tesis Doctoral los resultados obtenidos mediante MTT fueron complementados con ensayos por citometría de flujo orientados a la evaluación de muerte celular por apoptosis/necrosis, activación de caspasa-3, producción de ROS y alteraciones en la progresión del ciclo celular. Esta estrategia permitió caracterizar de forma más integral y los posibles efectos citotóxicos de los compuestos seleccionados y aportar información mecanística sobre las respuestas celulares observadas.

El análisis de apoptosis mediante citometría de flujo constituye una herramienta ampliamente utilizada debido a su capacidad para evaluar, de manera cuantitativa y simultánea, distintos eventos asociados a la muerte celular programada. Entre ellos se incluyen la externalización de fosfatidilserina, la pérdida de integridad de membrana, la activación de caspasas y, en determinados enfoques, la fragmentación del ADN. Sin embargo, la apoptosis es un proceso altamente dinámico y regulado, que involucra una secuencia de eventos moleculares, bioquímicos y morfológicos. Por este motivo, ningún marcador individual resulta suficiente para caracterizarla de manera integral. En este contexto, se recomienda la utilización de enfoques multiparamétricos que permitan integrar distintos indicadores celulares y obtener una interpretación más robusta de los resultados (Darzynkiewicz et al., 2004; Telford et al., 2018). La marcación con Anexina V/IP permite diferenciar células viables, células en apoptosis temprana, células en apoptosis tardía y células necróticas, aportando información sobre eventos asociados a la externalización de fosfatidilserina y a la pérdida de integridad de membrana. No

obstante, estos parámetros deben interpretarse en conjunto con otros biomarcadores, ya que algunos eventos apoptóticos pueden ser transitorios o depender del momento específico en que se realiza la medición. Dentro de este marco, la caspasa-3 representa un efector central en la fase de ejecución de la apoptosis. Su activación conduce a la clivación de múltiples sustratos celulares involucrados en los cambios morfológicos característicos de este proceso como la condensación de la cromatina, la fragmentación nuclear y la formación de cuerpos apoptóticos. No obstante, la activación de caspasa-3 puede ser transitoria y variar según el tipo celular, el estímulo aplicado y el tiempo de exposición, lo que puede dificultar su detección en determinados sistemas experimentales (Fox et al., 2008; Kaufmann et al., 2008). Por ello, la ausencia de activación detectable de caspasa-3 debe interpretarse en el contexto de otros indicadores de muerte celular y no como evidencia aislada.

En relación con el análisis del ciclo celular, la evaluación del contenido de ADN mediante citometría de flujo permite identificar alteraciones en la distribución de las células en las fases G0/G1, S y G2/M, así como la presencia de una población sub-G1, clásicamente asociada a fragmentación del ADN durante la apoptosis. Sin embargo, este enfoque también presenta limitaciones, ya que puede subestimar eventos apoptóticos tempranos, no detectar mecanismos alternativos de muerte celular o no discriminar con precisión entre diferentes tipos de daño genético, estrés replicativo o arrestos del ciclo celular inducidos por estrés celular. En conjunto, la ausencia de alteraciones significativas en los parámetros evaluados en esta Tesis Doctoral, incluyendo los perfiles de apoptosis/necrosis, la activación de caspasa-3 y la distribución del ciclo celular, sugiere que U-Omp19 y BSY02 no inducen muerte celular detectable bajo las condiciones experimentales empleadas en ambas líneas celulares. Esta conclusión, sustentada en la integración de múltiples aproximaciones metodológicas con diferente sensibilidad y especificidad, refuerza la robustez de los resultados obtenidos y permite sostener la ausencia de efectos citotóxicos relevantes en los modelos evaluados.

La utilidad de las metodologías basadas en la citometría de flujo ha sido ampliamente documentada en los campos de la toxicología, la inmunología y la oncología, ya que permiten evaluar de manera cuantitativa y simultánea distintos parámetros celulares frente a la exposición a diversos compuestos (Zhou et al., 2011; Chang et al., 2020; Shujaa Edin et al., 2021; Wang et al., 2021; Zhao, 2023).

En particular, la medición de ROS resulta fundamental para evaluar el rol del estrés oxidativo como posible mecanismo subyacente de citotoxicidad o daño genético, aportando información que no puede obtenerse únicamente a partir de ensayos convencionales de genotoxicidad (Tarantini et al., 2015 ; Zhang et al., 2015; Ribeiro et

al., 2020; Chen et al., 2021; Freire et al., 2021; Gomes et al., 2021). Las ROS cumplen funciones fisiológicas relevantes cuando se mantienen en niveles bajos o moderados, participando en procesos como la progresión del ciclo celular, la proliferación, la diferenciación, la migración y la muerte celular programada (Covarrubias et al., 2008). Sin embargo, cuando la producción de ROS supera los sistemas antioxidantes celulares, se genera un estado de estrés oxidativo. Este desequilibrio puede provocar daño sobre proteínas, lípidos, membranas, ácidos nucleicos y organelas celulares, especialmente las mitocondrias (Halliwell, 2011, Brieger et al., 2012; Kehrer y Klotz, 2015; Ghezzi et al., 2017). En este contexto, la generación excesiva de ROS constituye un mecanismo central que puede vincular la exposición a distintos compuestos con la inducción de genotoxicidad y citotoxicidad. A nivel genómico, el estrés oxidativo puede provocar daño directo en el ADN, incluyendo la formación de bases oxidadas, como 8-oxoguanina, así como rupturas de cadena simple y doble. Estos eventos pueden activar la respuesta al daño del ADN y asociarse a la fosforilación de la histona H2AX, generando γ H2AX como biomarcador temprano de daño genético (Klaunig et al., 2010; Valdiglesias et al., 2013). Asimismo, niveles elevados de ROS pueden inducir disfunción mitocondrial, favorecer la liberación de citocromo c y promover la activación de caspasas, contribuyendo al inicio de la apoptosis (Simon et al., 2000; Ott et al., 2007). De esta manera, la evaluación de ROS permite conectar distintos niveles de análisis celular, ya que el estrés oxidativo puede actuar como un punto de convergencia entre daño metabólico, alteraciones mitocondriales, activación apoptótica y daño genético.

Por estas razones, la citometría de flujo se ha consolidado como una herramienta de gran utilidad para el análisis de ROS a nivel de célula individual, permitiendo obtener mediciones rápidas, sensibles y reproducibles en poblaciones celulares definidas (Mukhopadhyay et al., 2007; Cossarizza et al., 2009; Jávega et al., 2023). Para este fin existen diversas sondas fluorescentes, cuya selección depende del tipo de especie reactiva que se desea evaluar, de las características del modelo celular y de las condiciones experimentales empleadas. Una de las sondas ampliamente utilizadas es la HE para la detección de anión $O_2^{\cdot-}$. Sin embargo, su especificidad es limitada, ya que puede ser oxidada por otras especies reactivas y generar productos fluorescentes inespecíficos distintos del 2-hidroxietidio. Esta característica puede conducir a una sobreestimación o a una interpretación ambigua de los niveles reales de superóxido cuando la señal fluorescente se analiza sin métodos complementarios de discriminación de productos de oxidación (Zielonka y Kalyanaraman, 2010; Kalyanaraman et al., 2012). Otra sonda frecuentemente utilizada es $H_2DCFH-DA$, una molécula no fluorescente y permeable a la célula, sensible a los cambios redox intracelulares. Una vez dentro de la

célula, las esterasas citoplasmáticas la convierten en 2',7'-diclorodihidrofluoresceína, que puede ser oxidada en presencia de peroxidasas y especies reactivas para formar la molécula fluorescente diclorofluoresceína. Sin embargo, esta sonda también presenta una especificidad limitada, ya que puede responder frente a diferentes ROS y nitrógeno. Por lo tanto, la señal de fluorescencia resultante debe interpretarse como un indicador general del estado oxidativo intracelular, y no como una medida específica de una única especie reactiva. En consecuencia, si bien las sondas fluorescentes para ROS son herramientas útiles y ampliamente utilizadas, sus resultados deben interpretarse considerando sus limitaciones en términos de especificidad, sensibilidad y localización subcelular de las especies detectadas. Estas limitaciones no son exclusivas de una sonda o metodología en particular, sino que constituyen una limitación inherente al estudio de ROS en sistemas biológicos complejos donde las especies reactivas pueden generarse de manera transitoria, localizada y altamente dependiente del contexto celular (Kalyanaraman et al., 2012; Winterbourn, 2014). Por ello, los resultados obtenidos mediante estas herramientas deben interpretarse de manera contextual e integrada con otros parámetros biológicos. En el presente trabajo de Tesis Doctoral, la ausencia de un incremento significativo en los niveles de ROS debe interpretarse con cautela, ya que no excluye completamente la posible generación localizada, transitoria o de baja magnitud de determinadas especies reactivas no detectadas por la metodología empleada. Sin embargo, la integración de estos resultados con los obtenidos mediante ensayos complementarios de citotoxicidad y genotoxicidad, incluyendo apoptosis/necrosis, activación de caspasa-3, análisis de ciclo celular, MN, γ H2AX y EC, permite sostener que, bajo las condiciones experimentales evaluadas, no se evidencian efectos biológicos adversos asociados a estrés oxidativo de magnitud suficiente como para desencadenar daño celular o genético detectable. Por lo tanto, si bien el análisis de ROS presenta limitaciones metodológicas inherentes, su interpretación en conjunto con un panel integrado de biomarcadores fortalece la conclusión de que los compuestos evaluados, U-Omp19 y BSY02, no indujeron citotoxicidad ni genotoxicidad detectable a través de mecanismos asociados a estrés oxidativo en los modelos celulares evaluados.

En relación con la evaluación de genotoxicidad *in vitro*, la aplicación combinada de MN, el ensayo cometa y la determinación de γ H2AX, permitió un abordaje complementario y sensible del daño al ADN. Entre estas metodologías, el ensayo de MN *in vitro* en células de mamífero cuenta con una guía regulatoria específica de la OECD, la TG 487, mientras que el ensayo cometa *in vitro* y la determinación de γ H2AX en líneas celulares, si bien son ampliamente utilizadas en investigación preclínica y mecanística, aún no

disponen de guías regulatorias estandarizadas equivalentes para su aplicación rutinaria en este contexto (Tice et al., 2000; Cordelli et al., 2021; OECD, 2023; Bessa et al., 2024; Arunachalam & Sreeja, 2025). No obstante, la bibliografía respalda ampliamente la integración de estos ensayos como herramientas complementarias, ya que permiten enriquecer la interpretación de los resultados y explorar mecanismos de daño genético a distintos niveles de organización celular (Olive & Banáth, 2006; Avlasevich et al., 2011; Smart et al., 2011; Sharma et al., 2012; Bryce et al., 2014). En este contexto, la ausencia de incrementos significativos en los distintos parámetros evaluados en el presente trabajo de Tesis Doctoral sugiere que los compuestos analizados no indujeron daño genético detectable bajo las condiciones experimentales empleadas. La concordancia entre metodologías que abordan diferentes niveles de organización del ADN refuerza la ausencia de efectos genotóxicos relevantes en los modelos celulares evaluados. Asimismo, la integración de estos hallazgos con los resultados de citotoxicidad ciclo celular y estrés oxidativo fortalece la interpretación global del perfil de seguridad de los compuestos evaluados.

Cabe destacar que, hasta donde se pudo relevar en la bibliografía disponible, no existen antecedentes que describan de manera específica la evaluación *in vitro* de citotoxicidad y genotoxicidad de las moléculas U-Omp19 y BSY02 mediante una batería de ensayos comparable a la implementada en esta Tesis Doctoral. En este sentido, los resultados obtenidos poseen un carácter novedoso y aportan información relevante para la caracterización preclínica de ambos compuestos.

Los estudios preclínicos realizados demostraron que, bajo las condiciones experimentales evaluadas, U-Omp19 y BSY02 no evidenciaron potencial citotóxico ni genotóxico detectable en las concentraciones ensayadas. En las metodologías aplicadas no se observaron diferencias significativas entre las células tratadas con los compuestos en estudio y las células control sin tratamiento, lo que refuerza la ausencia de efectos adversos relevantes en los modelos celulares utilizados.

La relevancia de estos resultados se sustenta en la implementación de una estrategia experimental integrada, que permitió evaluar distintos niveles de respuesta celular. La combinación de ensayos de viabilidad, muerte celular, activación de caspasa-3, producción de ROS, análisis del ciclo celular, detección de γ H2AX, ensayo de micronúcleos y ensayo cometa permitió abordar de manera complementaria procesos vinculados con la homeostasis celular, la estabilidad genómica y la respuesta frente al daño. En conjunto, estos hallazgos indican que los compuestos analizados no indujeron alteraciones detectables en procesos celulares críticos vinculados a la integridad genómica y la viabilidad celular bajo las condiciones experimentales empleadas. La

consistencia observada entre los distintos ensayos refuerza la robustez de los resultados obtenidos y destaca la importancia de utilizar enfoques integrados, capaces de superar las limitaciones inherentes a metodologías individuales. Si bien estos resultados no descartan la posibilidad de que los compuestos puedan generar efectos en contextos biológicos más complejos, frente a exposiciones prolongadas o en modelos celulares diferentes, la respuesta adecuada de los controles positivos confirma la sensibilidad de las metodologías implementadas y otorga solidez a las conclusiones alcanzadas.

En este marco, resulta pertinente analizar los resultados obtenidos para U-Omp19 considerando sus antecedentes funcionales y su mecanismo de acción propuesto. U-Omp19 ha sido caracterizado como un inhibidor de proteasas con propiedades inmunomoduladoras. Estudios previos demostraron que esta proteína es capaz de inhibir proteasas gastrointestinales y lisosomales, incluyendo catepsinas, lo que reduce la degradación intracelular de antígenos y aumenta su vida media dentro de células presentadoras de antígeno (Coria et al., 2016). Este efecto favorece la retención antigénica en compartimentos endolisosomales y promueve una presentación antigénica más eficiente, particularmente a través de la vía de MHC clase I, incrementando la activación de linfocitos T CD8⁺ (Coria et al., 2016). Adicionalmente, se ha demostrado que U-Omp19 actúa como un adyuvante capaz de modular la respuesta inmune tanto a nivel sistémico como de mucosas, induciendo respuestas de tipo Th1 y Th17, así como la producción de citoquinas como IFN- γ e IL-17 en modelos animales (Ibáñez et al., 2015). Estos efectos han sido asociados no solo a su capacidad de proteger antígenos frente a la degradación proteolítica, sino también a su interacción con células dendríticas, promoviendo su activación y reclutamiento en órganos linfoides secundarios (Pasquevich et al., 2016). Asimismo, se ha observado que U-Omp19 facilita el transporte transepitelial de antígenos sin comprometer la integridad de la barrera epitelial (Muñoz González et al., 2019). En este contexto, U-Omp19 se diferencia de adyuvantes clásicos, cuyos mecanismos de acción se basan principalmente en la activación de receptores de reconocimiento de patrones y en la inducción de respuestas inflamatorias que, dependiendo del contexto, pueden asociarse con estrés celular o efectos citotóxicos (Kawai y Akira, 2010). En cambio, U-Omp19 ejercería su acción mediante un mecanismo alternativo, centrado en la modulación del procesamiento antigénico y en la regulación de la respuesta inmune, sin evidencia de activación inflamatoria exacerbada en los modelos descriptos.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo de Tesis Doctoral, son consistentes con este perfil funcional, ya que no se evidenció activación de caspasa-3, alteraciones

relevantes en el ciclo celular ni incremento en la generación de ROS en células tratadas con U-Omp19. Estos hallazgos sugieren que, bajo las condiciones experimentales evaluadas, el compuesto no desencadenó mecanismos celulares asociados a apoptosis, estrés oxidativo o alteraciones proliferativas detectables. Asimismo, la ausencia de genotoxicidad, evidenciada mediante la evaluación de γ H2AX, el ensayo de MN y EC, indica que U-Omp19 no indujo daño detectable en el ADN ni inestabilidad cromosómica en los modelos celulares utilizados. Esta observación resulta coherente con un mecanismo que no implicaría una interacción directa con el material genético.

La bibliografía disponible sobre adyuvantes biológicos y péptidos inmunomoduladores con perfiles de seguridad comparables al de U-Omp19 es aún escasa. Un antecedente relevante es el trabajo de Magnelli et al. (2021), en el cual se evaluó la seguridad genotóxica de saponinas y de hidróxido de aluminio en combinación con la proteína L1 del virus del papiloma bovino. Mediante la aplicación de técnicas complementarias, incluyendo EC, CBMN y citometría de flujo con Anexina V/IP, los autores demostraron que ambas combinaciones indujeron un nivel intermedio de daño en el ADN, siendo este más pronunciado en el caso de las saponinas. Estos resultados evidencian que los adyuvantes o formulaciones vacunales pueden presentar perfiles de seguridad variables y que, por lo tanto, requieren una caracterización específica. De la misma manera, Genghini et al. (2006) reportaron efectos genotóxicos asociados al uso de vacunas a virus vivos contra la peste porcina clásica. Mediante ensayos citogenéticos *in vitro* en cultivos de linfocitos, que incluyeron la evaluación de alteraciones cromosómicas y EC, se evidenció que dichos efectos fueron dependientes de la dosis y se manifestaron tanto a nivel citogenético como molecular. Estos hallazgos respaldan la posibilidad de que determinadas formulaciones vacunales o componentes biológicos puedan inducir daño genético bajo condiciones experimentales específicas (Genghini et al., 2006). Por otro lado, Cervantes-Torres et al. (2019) evaluaron el perfil de seguridad del adyuvante peptídico GK-1. Su caracterización preclínica incluyó ensayos *in vitro* de genotoxicidad, como el ensayo de MN, aberraciones cromosómicas y el test de Ames, realizados de acuerdo con las directrices de la OCDE. Los resultados demostraron que GK-1 no presentó de potencial mutagénico ni genotóxico en los sistemas evaluados, lo que respalda su perfil de seguridad y sustenta su consideración como adyuvante en formulaciones vacunales contra la influenza (Cervantes-Torres et al., 2019).

En conjunto, estos antecedentes muestran que la seguridad genotóxica de adyuvantes y formulaciones vacunales no puede asumirse únicamente a partir de su naturaleza biológica, sino que debe ser evaluada experimentalmente mediante metodologías adecuadas. En este marco, los resultados obtenidos para U-Omp19 adquieren

relevancia, ya que aportan evidencia específica sobre la ausencia de efectos citotóxicos y genotóxicos detectables bajo las condiciones evaluadas en esta Tesis Doctoral.

En relación con BSY02, los resultados obtenidos en este trabajo de Tesis Doctoral pueden interpretarse a la luz de los mecanismos alternativos de señalización descritos para moléculas derivadas de eritropoyetina con actividad con potencial actividad neuroprotectora. A diferencia de la eritropoyetina nativa, cuya actividad biológica clásica se ejerce principalmente a través de la activación del receptor homodimérico eritropoyetina (EPOR) asociado a la eritropoyesis, se ha propuesto que algunas variantes modificadas o derivados no hematopoyéticos pueden interactuar preferentemente con complejos receptores alternativos, incluyendo aquellos formados por EPOR y la subunidad β común (CD131). Esta interacción se ha vinculado con la activación de vías de señalización asociadas a protección tisular, sin inducir de manera significativa la proliferación eritroide (Brines y Cerami, 2005). Diversos estudios han descrito que estas vías alternativas pueden promover la activación de cascadas intracelulares como PI3K/Akt y STAT3, involucradas en procesos de supervivencia celular, inhibición de la apoptosis, reducción del estrés oxidativo y la modulación de la respuesta inflamatoria (Brines et al., 2008). Asimismo, en modelos experimentales *in vivo*, moléculas derivadas de eritropoyetina con actividad citoprotectora han evidenciado efectos neuroprotectores significativos, incluyendo reducción del daño neuronal, preservación de la integridad tisular y mejora funcional tras eventos isquémicos o inflamatorios, sin inducir efectos adversos asociados a la eritropoyesis, como el aumento del hematocrito (Leist et al., 2004). En este contexto, la ausencia de citotoxicidad, activación de caspasa-3, generación de ROS y alteraciones en el ciclo celular observada en el presente trabajo de Tesis Doctoral resulta compatible con un perfil biológico asociado a la preservación de la homeostasis celular, más que en la inducción de respuestas proliferativas, apoptóticas o de estrés celular. No obstante, es importante señalar que los ensayos realizados en esta tesis no estuvieron dirigidos a demostrar directamente la activación de vías de señalización específicas, sino a evaluar la posible inducción de efectos citotóxicos y genotóxicos bajo condiciones experimentales definidas. Asimismo, la ausencia de genotoxicidad evidenciada mediante la determinación de γ H2AX, MN y EC sugiere que BSY02 no indujo daño detectable en el ADN ni inestabilidad cromosómica en los modelos celulares evaluados. Este resultado resulta coherente con el perfil esperado para una molécula biológica cuya acción se encontraría vinculada principalmente con la modulación de vías de señalización intracelular, y no con interacciones directas con el material genético. En comparación con otros agentes biológicos o farmacológicos que pueden inducir efectos citotóxicos

como parte de su mecanismo de acción, las eritropoyetinas modificadas y sus derivados citoprotectores presentan un perfil distintivo, caracterizado por la promoción de respuestas asociadas a supervivencia celular y protección frente a daño inducido por estrés. En este sentido, los resultados obtenidos para BSY02 aportan evidencia experimental favorable para su caracterización preclínica, ya que no se observaron efectos citotóxicos ni genotóxicos detectables en las concentraciones y modelos celulares evaluados.

Por otro lado, si bien no se han reportado estudios orientados específicamente a estudiar su potencial citotóxico o genotóxico de BSY02, existen antecedentes con moléculas estructural o funcionalmente relacionadas. En este sentido, Shokrzadeh et al. (2020) evaluaron el efecto protector de ARA290, un péptido no hematopoyético derivado de la eritropoyetina, frente a la toxicidad inducida por DOX en distintas líneas celulares. Para ello, los autores aplicaron un conjunto de técnicas complementarias, incluyendo el ensayo de MTT, el ensayo de MN, el EC y la caracterización de parámetros asociados a estrés oxidativo, actividad de enzimas antioxidantes, la inflamación y apoptosis. Los resultados evidenciaron que ARA290 atenuó el daño al ADN y el estrés oxidativo inducidos por la DOX, lo que respalda su capacidad citoprotectora (Shokrzadeh et al., 2020).

De manera similar, Sooklert et al. (2016) analizaron el potencial protector de GEPO, un derivado de la eritropoyetina obtenido por modificación con glutaraldehído, frente a la toxicidad inducida por nanopartículas de plata en células HEK293, línea celular derivada de células de riñón embrionario humano. En este estudio se aplicaron metodologías orientadas a la determinación de viabilidad celular, morfología y proliferación, así como a la evaluación de estrés oxidativo y de la expresión de proteínas antiapoptóticas como Bcl2. Los resultados mostraron que GEPO disminuyó la citotoxicidad y el estrés oxidativo inducidos por las nanopartículas, preservó la morfología celular y promovió la activación de mecanismos antiapoptóticos (Sooklert et al., 2016). Estos hallazgos resaltan la relevancia de integrar parámetros funcionales y moleculares para la caracterización toxicológica de nuevas moléculas y nanomateriales, así como para la evaluación de agentes con propiedades citoprotectoras.

Asimismo, Jeong et al. (2014) desarrollaron nanopartículas de PLGA [poli (ácido láctico-co-ácido glicólico)] cargadas con rhEPO y estabilizadas con colato de sodio (rhEPO-Ch-NP), las cuales fueron evaluadas en un modelo *in vitro* de citotoxicidad inducida por glutamato en células SH-SY5Y. Para la determinación de los efectos citotóxicos y morfológicos se emplearon el ensayo de MTT y la tinción con DAPI, que permitieron la determinación de viabilidad celular y los cambios morfológicos nucleares mediante

microscopía, respectivamente. Los resultados demostraron que las rhEPO-Ch-NP presentaron un perfil de seguridad superior al de la rhEPO libre y ejercieron una mayor protección neuronal, preservando la morfología celular frente al daño inducido por glutamato. Estos hallazgos resaltan el potencial de las nanoformulaciones para mejorar la eficacia, estabilidad y seguridad de moléculas con actividad citoprotectora.

En conjunto, estos antecedentes resultan consistentes con los resultados obtenidos para BSY02 en la presente Tesis Doctoral, ya que respaldan un perfil de seguridad favorable de moléculas derivadas o relacionadas con eritropoyetina en modelos celulares sometidos a distintos tipos de estrés. Si bien los estudios citados evaluaron principalmente efectos protectores frente a estímulos tóxicos específicos, mientras que en esta tesis se analizó el potencial citotóxico y genotóxico directo de BSY02, todos ellos refuerzan la importancia de integrar ensayos funcionales, oxidativos, apoptóticos y genotóxicos para caracterizar de manera más completa el perfil de seguridad de estas moléculas.

El empleo de las metodologías seleccionadas para las evaluaciones llevadas a cabo en este trabajo de Tesis Doctoral permitió ampliar la comprensión de los posibles mecanismos de acción y de los eventos celulares asociados tanto a toxicidad como a protección celular, reforzando la necesidad de incorporar este tipo de aproximaciones en los estudios preclínicos. En este marco, los resultados obtenidos ponen en evidencia el valor de las estrategias integradas en toxicología *in vitro*, ya que permiten una evaluación más robusta, reproducible y predictiva del perfil de seguridad de nuevos compuestos. Este enfoque no solo fortalece la interpretación de los datos experimentales, sino que también contribuye a la generación de evidencia científica sólida y trazable. A futuro, este tipo de información podría servir como base para la incorporación progresiva de metodologías alternativas y complementarias dentro de los marcos regulatorios de evaluación toxicológica, especialmente en etapas tempranas del desarrollo preclínico.

Finalmente, el desarrollo e incorporación de nuevas tecnologías, tales como los co-cultivos, sistemas tridimensionales (3D), organoides y las plataformas microfluídicas, surge como una línea de proyección natural a partir de los resultados presentados en esta Tesis Doctoral. Estos modelos avanzados permiten reproducir con mayor fidelidad la microarquitectura tisular, el microambiente celular y las interacciones dinámicas entre distintos tipos celulares, aspectos que no pueden ser completamente representados por cultivos bidimensionales convencionales. En particular, las plataformas microfluídicas y los sistemas *organ-on-chip* ofrecen la posibilidad de integrar parámetros funcionales como el flujo, la presencia de barreras tisulares, gradientes bioquímicos y la conectividad

entre compartimentos. Estas características podrían contribuir a una evaluación más precisa del comportamiento biológico y toxicológico de compuestos bioactivos en condiciones más cercanas a la fisiología humana (Fröhlich, 2018; Xu et al., 2020). Asimismo, la integración de estos modelos experimentales avanzados con herramientas *in silico*, como los modelos QSAR (*Quantitative Structure–Activity Relationship*), la biología de sistemas y los modelos matemáticos mecanísticos, representa una perspectiva prometedora para optimizar el diseño de estudios preclínicos. Estas aproximaciones permitirían orientar de manera más racional la selección de compuestos, concentraciones, tiempos de exposición y biomarcadores de análisis, favoreciendo una evaluación más predictiva, eficiente y alineada con los enfoques actuales de toxicología integrativa (Williams et al., 2013; Fröhlich, 2018; Van Norman, 2019).

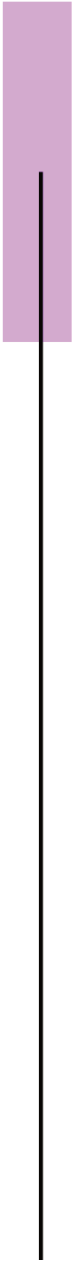
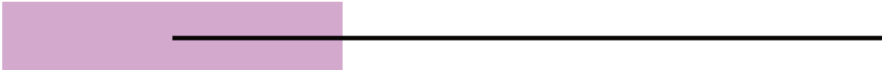
Como proyección metodológica, sería de interés incorporar en futuros estudios sistemas que permitan evaluar con mayor profundidad la posible participación del metabolismo en la respuesta celular frente a los compuestos analizados. En particular, la inclusión de sistemas de activación metabólica exógenos, como la fracción S9 hepática, podría aportar información complementaria sobre la eventual generación de metabolitos activos o tóxicos. Si bien esta aproximación no fue incorporada en el diseño experimental de la presente Tesis Doctoral debido a la disponibilidad limitada y al elevado costo de los reactivos necesarios, su implementación futura permitiría ampliar la caracterización preclínica de U-Omp19 y BSY02. Asimismo, sería pertinente complementar estos estudios con modelos celulares hepáticos humanos, como HepG2, u otros sistemas con mayor competencia metabólica. Las células HepG2 poseen cierta capacidad metabólica endógena, y son ampliamente utilizadas en estudios de hepatotoxicidad y toxicología *in vitro*; no obstante, no reproducen por completo el metabolismo sistémico. Por este motivo, su incorporación debería considerarse como una herramienta complementaria, capaz de aportar información adicional y fortalecer la interpretación de los resultados obtenidos.

La interpretación de estos resultados y su extrapolación al contexto *in vivo* deben realizarse con cautela, ya que la respuesta observada en cultivos celulares puede diferir de la que se produce en un sistema biológico completo. En este sentido, los hallazgos obtenidos constituyen una etapa inicial de la evaluación preclínica y podrían ser complementados, en futuras etapas, con modelos experimentales más complejos, diferentes tiempos de exposición y condiciones fisiológicamente más representativas, a

fin de continuar profundizando la caracterización del perfil de seguridad de U-Omp19 y BSY02.

De esta manera, esta Tesis Doctoral no solo aportan evidencia inédita sobre el perfil de seguridad *in vitro* de U-Omp19 y BSY02, sino que también sienta las bases para futuras investigaciones orientadas a la implementación de modelos *in vitro* más complejos y fisiológicamente relevantes. La consolidación de enfoques integrados, que combinen ensayos celulares convencionales, modelos avanzados y herramientas computacionales, se proyecta como un paso clave para fortalecer la predictividad biológica de los estudios preclínicos y avanzar hacia una reducción progresiva, racional y científicamente fundamentada del uso de modelos *in vivo* (Fröhlich, 2018; Van Norman, 2019; Dourson et al., 2022).

Finalmente, esta Tesis Doctoral contribuye al desarrollo de estrategias preclínicas más robustas, reproducibles y éticamente alineadas, orientadas a mejorar la evaluación temprana de la seguridad de nuevos compuestos con potencial aplicación biomédica.



6. CONCLUSIONES



El presente trabajo de Tesis Doctoral permitió poner a punto y optimizar una batería de ensayos *in vitro* para la evaluación de citotoxicidad y genotoxicidad de nuevos compuestos en etapas tempranas del desarrollo preclínico. La utilización de distintos biomarcadores, evaluados en dos líneas celulares de diferente origen, permitió abordar de manera integrada la detección de posibles efectos adversos a nivel celular y genómico.

En relación con el compuesto U-Omp19, los resultados obtenidos a partir de los distintos biomarcadores evaluados en ambas líneas celulares permiten concluir que:

- Los ensayos de viabilidad celular no evidenciaron efectos citotóxicos significativos en las condiciones experimentales analizadas.
- La evaluación de apoptosis y necrosis, junto con la determinación de la actividad de caspasa-3, no mostró activación de vías de muerte celular programada.
- La determinación de ROS no evidenció la inducción de estrés oxidativo.
- Los ensayos de genotoxicidad, incluyendo el EC y la detección de γ H2AX, no mostraron incremento del daño primario del ADN.
- El ensayo de MN no evidenció inducción de daño cromosómico ni alteraciones en la segregación cromosómica.

En conjunto, estos resultados indican que U-Omp19 no indujo efectos adversos detectables a nivel celular ni genómico bajo las condiciones evaluadas, considerando las líneas celulares, el tiempo de exposición y las concentraciones ensayadas. Estos hallazgos resultan consistentes con un perfil de seguridad *in vitro* favorable y aportan evidencia experimental relevante para complementar su caracterización preclínica como adyuvante biológico.

En cuanto a BSY02, los resultados obtenidos permiten concluir que:

- No se observaron alteraciones significativas en la viabilidad celular, lo que indica ausencia de citotoxicidad detectable en las condiciones ensayadas.
- Los análisis de apoptosis, necrosis y actividad de caspasa-3 no evidenciaron activación de mecanismos de muerte celular.
- No se detectaron incrementos en la producción de ROS, lo que sugiere ausencia de estrés oxidativo inducido.
- Los ensayos de genotoxicidad, incluyendo el EC y la detección de γ H2AX, no mostraron incremento en el daño primario del ADN.

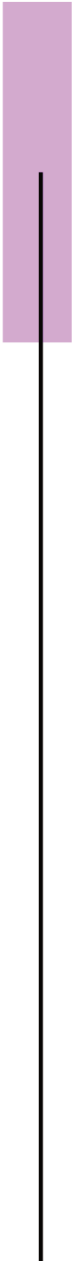
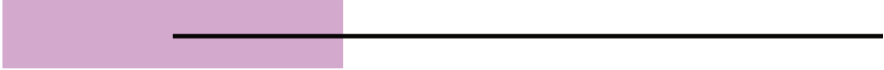
- El ensayo de MN no evidenció inducción de daño cromosómico ni alteraciones en la segregación cromosómica.

Estos hallazgos indican que BSY02 presenta un perfil de seguridad *in vitro* favorable en los modelos celulares evaluados, sin evidencias de citotoxicidad ni genotoxicidad detectable bajo las condiciones experimentales analizadas.

La integración de múltiples biomarcadores permitió no solo detectar posibles efectos adversos, sino también explorar mecanismos celulares asociados a citotoxicidad y genotoxicidad, incluyendo estrés oxidativo, activación de apoptosis, alteraciones del ciclo celular y daño genético. Este enfoque resulta particularmente relevante para la evaluación de seguridad de moléculas biológicas, cuya complejidad estructural y funcional puede dar lugar a respuestas celulares no detectables mediante ensayos individuales.

Asimismo, la implementación de metodologías complementarias, algunas de ellas reconocidas en guías internacionales, contribuyó a fortalecer la robustez de los resultados obtenidos y se encuentra en concordancia con las tendencias actuales en toxicología preclínica y con los principios de las 3Rs del uso de animales de experimentación.

En conjunto, esta Tesis Doctoral aporta evidencia experimental precisa sobre el perfil de seguridad *in vitro* de U-Omp19 y BSY02, y consolida una plataforma metodológica aplicable a la evaluación temprana de citotoxicidad y genotoxicidad de nuevos candidatos terapéuticos. Los resultados obtenidos constituyen una base relevante para futuros estudios preclínicos a profundizar la caracterización de ambos compuestos en modelos experimentales más complejos y fisiológicamente representativos.



7. BIBLIOGRAFÍA

- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. (2002). The Cell Cycle and Programmed Cell Death. En: *Molecular Biology of the Cell* (4th ed.). New York. USA. Garland Science.
- Anderson, D., Yu, T.-W., McGregor, D. B. (1998). Comet assay responses as indicators of carcinogen exposure. *Mutagenesis*. 13, 6: 539-55.
- Andrighetti-Fröhner, C. R., Kratz, J. M., Antonio, R. V., Creczynski-Pasa, T. B., Barardi, C. R. M., Simões, C. M. O. (2006). In vitro testing for genotoxicity of violacein assessed by Comet and Micronucleus assays. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 603(1), 97–103.
- Araldi, R. P., Rechiutti, B. M., Mendes, T. B., Ito, E. T., Souza, E. B. (2014). Mutagenic potential of *Cordia ecalyculata* alone and in association with *Spirulina maxima* for their evaluation as candidate anti-obesity drugs. *Genetics and Molecular Research*, 13(3), 5207–5220.
- Arango, M., Quintero-Ronderos, P., Castiblanco, J., Montoya-Ortíz, G. (2013). Cell culture and cell analysis, First Edition. Section V. *Basic principles of laboratory*. Bogotá, Colombia. 45, 741-754.
- Arunachalam, K., Sreeja, P. S. (2025). In Vitro Assessment of Genotoxicity Using the Comet Assay in CHO-K1 Cells. *Advanced Cell and Molecular Techniques. Springer Protocols Handbooks*. 249–257.
- Aslantürk, Ö. S. (2018). In Vitro Cytotoxicity and Cell Viability Assays: Principles, Advantages, and Disadvantages. *Genotoxicity - A Predictable Risk to Our Actual World*. InTechOpen. 978-1-78923-418-3.
- Autret, A., Martin, S. J. (2009). Emerging Role for Members of the Bcl-2 Family in Mitochondrial Morphogenesis. *Molecular Cell*. 36, 3, 355–363.
- Avlasevich, S., Bryce, S., De Boeck, M., Elhajouji, A., Van Goethem, F., Lynch, A., Nicolette, J., Shi, J., Dertinger, S. (2011). Flow cytometric analysis of micronuclei in mammalian cell cultures: past, present and future. *Mutagenesis*. 26(1):147-52.
- Azqueta, A., Collins, A. R. (2013). The essential comet assay: A comprehensive guide to measuring DNA damage and repair. *Archives of Toxicology*. 87, 6, 949–968.
- Bas, A., Burns, N., Gulotta, A., Junker, J., Drasler, B., Lehner, R., Aicher, L., Constant, S., Petri-Fink, A., Rothen-Rutishauser, B. (2021). Understanding the Development, Standardization, and Validation Process of Alternative In Vitro Test Methods for Regulatory Approval from a Researcher Perspective. *Small*. 17(15): e2006027.
- Benedetti, M. D., Lenze, M., García, M. R., Raabe, H., Sullivan, K., Pina, J. I., Wikinski, S., Gutiérrez, M. L. (2025). Argentina's Progress Towards Adopting New Alternative Methods in Safety Testing: The Role of the Laboratorio de Métodos Alternativos. *Altex*, 42(2), 358–360.
- Benítez-Briebesca, L, Sánchez-Suárez, P. (1999). Oxidative Damage, Bleomycin, and Gamma Radiation Induce Different Types of DNA Strand Breaks in Normal Lymphocytes and Thymocytes: A Comet Assay Study. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 887: 133-149.

- Bessa, M. J., Silva, A. M., Delerue-Matos, C., Rodrigues, F. (2024). *Toxicity Assessment of Food and By-Products: In Vitro Methods*. In: Figueiredo González, M., Reboredo Rodríguez, P., Martínez Carballo, E. (eds) Extraction, Characterization, and Functional Assessment of Bioactive Compounds. 169–180. *Methods and Protocols in Food Science*. Humana, New York. USA.
- Bihari, N. (2017). Rapid assessment of genotoxicity by flow cytometric detection of cell cycle alterations. *Methods in Molecular Biology*. 1644, 13–21.
- Bindokas, V. P., Jordbn, J., Lee, C. C., Miller, R. J. (1996). Superoxide Production in Rat Hippocampal Neurons: Selective Imaging with Hydroethidine. *The Journal of Neuroscience*. 15;16(4):1324-36.
- Brandão, F., Fernández-Bertólez, N., Rosário, F., Bessa, M. J., Fraga, S., Pásaro, E., Teixeira, J. P., Laffon, B., Valdiglesias, V., Costa, C. (2020). Genotoxicity of TiO₂ Nanoparticles in Four Different Human Cell Lines (A549, HEPG2, A172 and SH-SY5Y). *Nanomaterials*. 27;10(3):412.
- Brieger, K., Schiavone, S., Miller, F. J., Krause, K. H. (2012). Reactive oxygen species: From health to disease. *Swiss Medical Weekly*. 17: 142: w13659.
- Brines, M., Cerami, A. (2005). Emerging biological roles for erythropoietin in the nervous system. *Nature Reviews Neurosciences* 6, 484–494.
- Brines, M., Patel, N.S., Villa, P., Brines, C., Mennini, T., De Paola, M., Erbayraktar, Z., Erbayraktar, S., Sepodes, B., Thiemermann, C., Ghezzi, P., Yamin, M., Hand, C.C., Xie, Q.W., Coleman, T., Cerami, A. (2008). Nonerythropoietic, tissue-protective peptides derived from the tertiary structure of erythropoietin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 105(31):10925-30.
- Bryce, S.M., Bemis, J.C., Mereness, J.A., Spellman, R.A., Moss, J., Dickinson, D., Schuler, M.J. and Dertinger, S.D. (2014). Interpreting in vitro micronucleus positive results: Simple biomarker matrix discriminates clastogens, aneugens, and misleading positive agents. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. (55), 542-555.
- Cardoso, R., Dusinska, M., Collins, A., Manjanatha, M., Pfuhler, S., Registre, M., Elespuru, R. (2022). *In vivo* Mammalian Alkaline Comet Assay: Method Adapted for Genotoxicity Assessment of Nanomaterials. *Frontiers in Toxicology* 4:903896.
- Cartus, A., Schrenk, D. (2017). Current methods in risk assessment of genotoxic chemicals. *Food and Chemical Toxicology*. 106, 574–582.
- Cervantes-Torres, J., Gracia-Mora, I., Segura-Velazquez, R., Montero-Montoya, R., Espinosa-Aguirre, J., E. Gonsebatt, M., Camacho-Carranza, R., Rivera-Huerta, M., Sanchez-Bartez, F., Tinoco-Méndez, M., Ostrosky-Wegman, P., Fragoso, G., Sciutto, E. (2019). Preclinical evidences of safety of a new synthetic adjuvant to formulate with the influenza human vaccine: absence of subchronic toxicity and mutagenicity. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*. 41(1), 140–149.
- César, J., Arranz, E., Carrasco Velar, R., Alexander, J., García, P. (2008). *Introducción al diseño racional de fármacos*. Ciudad de La Habana- Cuba. Editorial Universitaria. 1- 45.
- Chang, H. H., Shih, W. C., Wang, Y. L., Tsai, Y. L., Chen, Y. J., Chang, M. C., Jeng, J. H. (2020). Cytotoxicity and genotoxicity of DMABEE, a co-photoinitiator of resin

- polymerization, on CHO-K1 cells: Role of redox and carboxylesterase. *Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials*. 108(5), 2088–2098.
- Chen, J., Jin, X., Shen, Z., Mei, Y., Zhu, J., Zhang, X., Liang, G., Zheng, X. (2021). H₂O₂ enhances the anticancer activity of TMPyP4 by ROS-mediated mitochondrial dysfunction and DNA damage. *Medical Oncology*. 21;38(6):59.
- Chen, Q., Gong, B., Almasan, A. (2000). Distinct stages of cytochrome c release from mitochondria: evidence for a feedback amplification loop linking caspase activation to mitochondrial dysfunction in genotoxic stress induced apoptosis. *Cell death & Differentiation*. 7(2):227-33.
- Choudhary, G. S., Al-harbi, S., Almasan, A. (2015a). Caspase-3 Activation Is a Critical Determinant of Genotoxic Stress-Induced Apoptosis. *Methods in Molecular Biology*. 1219:1-9.
- Cimino, M. C. (2006). Comparative overview of current international strategies and guidelines for genetic toxicology testing for regulatory purposes. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 47,5,362–390.
- Coecke, S., Balls, M., Bowe, G., Davis, J., Gstraunthaler, G., Hartung, T., Hay, R., Merten, O.-W., Price, A., Schechtman, L., Stacey, G., Stokes, W. (2005). Guidance on Good Cell Culture Practice. A Report of the Second ECVAM Task Force on Good Cell Culture Practice. *Alternative to Laboratory Animals*. 33(3):261-87.
- Cole, S. P. C. (1986). Rapid chemosensitivity testing of human lung tumor cells using the MTT assay. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*. 17(3):259-63.
- Collins, A. R. (2004). The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. *Molecular Biotechnology*. 26(3):249-61
- Cordelli, E., Bignami, M., Pacchierotti, F. (2021). Comet assay: A versatile but complex tool in genotoxicity testing. *Toxicology Research*. 10,1, 68–78.
- Coria, L. M., Ibañez, A. E., Tkach, M., Sabbione, F., Bruno, L., Carabajal, M. V, Berguer, P. M., Barrionuevo, P., Schillaci, R., Trevani, A. S., Giambartolomei, G. H., Pasquevich, K. A., Cassataro, J. (2016). A Brucella spp. Protease Inhibitor Limits Antigen Lysosomal Proteolysis, Increases Cross-Presentation, and Enhances CD8+ T Cell Responses. *The Journal of Immunology*. 196(10), 4014–4029.
- Coria, L. M., Risso, G. S., Guaimas, F. F., Ferrero, M. C., Bruno, L., Pasquevich, K. A., Cassataro, J. (2019). Oral co-administration of a bacterial protease inhibitor in the vaccine formulation increases antigen delivery at the intestinal epithelial barrier. *Journal of Controlled Release*. 293, 158–171.
- Coria, L.M., Saposnik, L.M., Pueblas Castro, C., Castro, E.F., Bruno, L.A., Stone, W.B., Pérez, P.S., Darriba, M.L., Chemes, L.B., Alcain, J., Mazzitelli, I., Varese, A., Salvatori, M., Auguste, A.J., Álvarez, D.E., Pasquevich, K.A., Cassataro, J. (2022). A Novel Bacterial Protease Inhibitor Adjuvant in RBD-Based COVID-19 Vaccine Formulations Containing Alum Increases Neutralizing Antibodies, Specific Germinal Center B Cells and Confers Protection Against SARS-CoV-2 Infection in Mice. *Frontiers in Immunology* 13:844837.
- Corradi, M., Goldoni, M., Mutti, A. (2015). A review on airway biomarkers: exposure, effect and susceptibility. *Expert Review of Respiratory Medicine* 9(2):205-20.

- Corvi, R., Madia, F. (2017). In vitro genotoxicity testing—Can the performance be enhanced?. *Food and Chemical Toxicology*. 106, 600–608.
- Cossarizza, A., Ferraresi, R., Troiano, L., Roat, E., Gibellini, L., Bertoncelli, L., Nasi, M., Pinti, M. (2009). Simultaneous analysis of reactive oxygen species and reduced glutathione content in living cells by polychromatic flow cytometry. *Nature Protocols*. 4(12), 1790–1797.
- Cotelle, S., Férard, J. F. (1999). *Comet Assay in Genetic Ecotoxicology: A Review. Environmental and Molecular Mutagenesis*. 34(4):246-55
- Covarrubias, L., Hernández-García, D., Schnabel, D., Salas-Vidal, E., Castro-Obregón, S. (2008). Function of reactive oxygen species during animal development: Passive or active?. *Developmental Biology*. 320,1,1–11.
- Custer, L. L., Sweder, K. S. (2008). The Role of Genetic Toxicology in Drug Discovery and Optimization. *Current Drug Metabolism*. 9(9):978-85
- Darriba, M. L., Castro, C. P., Coria, L. M., Bruno, L., Laura Cerutti, M., Otero, L. H., Chemes, L. B., Rasia, R. M., Klinke, S., Cassataro, J., Pasquevich, K. A. (2022). A disordered region retains the full protease inhibitor activity and the capacity to induce CD8+ T cells in vivo of the oral vaccine adjuvant U-Omp19. *Computational and Structural Biotechnology Journal*. 20, 5098–5114.
- Darriba, M. L., Cerutti, M. L., Bruno, L., Cassataro, J., Pasquevich, K. A. (2021). Stability Studies of the Vaccine Adjuvant U-Omp19. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 110(2), 707–718.
- Darzynkiewicz, Z., Huang, X., Okafuji, M., King, M.A. (2004). Cytometric methods to detect apoptosis. *Methods in Cell Biology*. 75:307-41.
- Darzynkiewicz, Z., Huang, X., Zhao, H. (2017). Analysis of cellular DNA content by flow cytometry. *Current Protocols in Immunology*. 5.7.1-5.7.20.
- Da Silva, J., Franco, D., García, A.L., Pacheco-Pantoja, E.L., Simoniello, M.F., Tirado, N., Yáñez-Estrada, L., Espinosa-Reyes, G., Flores-Márquez, A.R., Gómez-Arroyo, S., Ilizaliturri-Hernández, C., Lafon-Hughes, L., León-Mejía, G., Mussali-Galante, P., Narváez, D.M., Poletta, G.L., de Arcaute, C.R., Soloneski, S., Tovar-Sánchez, E., Valverde, M., Rojas, E. (2026). Alkaline comet assay in human biomonitoring studies by the Latin America / LA-COMET group. *Mutation Research: Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 912:503940.
- Deore, A. B., Dhumane, J. R., Wagh, R., Sonawane, R. (2019). The Stages of Drug Discovery and Development Process. *Asian Journal of Pharmaceutical Research and Development*. 7(6), 62–67.
- Dhawan, A., Bajpayee, M. (2013). Genotoxicity Assessment Methods and Protocols. *Methods in Molecular Biology*. 1044.
- Di Sotto, A., Maffei, F., Hrelia, P., Di Giacomo, S., Pagano, E., Borrelli, F., Mazzanti, G. (2014). Genotoxicity assessment of some cosmetic and food additives. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 68(1), 16–22.
- Dourson, M., Ewart, L., Fitzpatrick, S.C., Barros, S.B.M., Mahadevan, B., Hayes, A.W. (2022). The Future of Uncertainty Factors With In Vitro Studies Using Human Cells. *Toxicological Sciences*. 186(1):12-17

- Dusinska, M., Mariussen, E., Rundén-Pran, E., Hudecova, A. M., Elje, E., Kazimirova, A., El Yamani, N., Dommershausen, N., Tharmann, J., Fieblinger, D., Herzberg, F., Luch, A., Haase, A. (2019). In vitro approaches for assessing the genotoxicity of nanomaterials. *Methods in Molecular Biology*. 1894,83–122.
- Duthie, S. J., Hawdon, A. (1998). *DNA instability (strand breakage, uracil misincorporation, and defective repair) is increased by folic acid depletion in human lymphocytes in vitro*. *FASEB Journal*. 12(14):1491-7.
- EFSA Scientific Committee. (2011). Scientific opinion on genotoxicity testing strategies applicable to food and feed safety assessment. *EFSA Journal*. 9(9).
- El-Hefny, I. M., Al Senosy, N. K., Hozayen, W. G., Ahmed, A. E., Diab, A., & Basal, W. T. (2020). Evaluation of the Cytotoxicity and Apoptotic Induction in Human Liver Cell Lines Exposed to Three Food Additives. *Recent Patents on Food, Nutrition & Agriculture*. 11(3), 193–201.
- El Yamani, N., Rundén-Pran, E., Collins, A.R., Longhin, E.M., Elje, E., Hoet, P., Vinković Vrček, I., Doak, S.H., Fessard, V., Dusinska, M. (2022). The miniaturized enzyme-modified comet assay for genotoxicity testing of nanomaterials. *Frontiers in Toxicology*. 4:986318.
- Eskes, C., Whelan, M. (2016). *Validation of Alternative Methods for Toxicity Testing*. Springer International Publishing. Springer Nature Switzerland AG 2016 (856).
- Evans, S. J., Clift, M. J. D., Singh, N., Wills, J. W., Hondow, N., Wilkinson, T. S., Burgum, M. J., Brown, A. P., Jenkins, G. J., Doak, S. H. (2019). In vitro detection of in vitro secondary mechanisms of genotoxicity induced by engineered nanomaterials. *Particle and Fibre Toxicology*. 13;16(1):8.
- Fenech, M. (2000). The in vitro micronucleus technique. *Mutation Research*. 20;455(1-2):81-95.
- Fenech, M. (2007). Cytokinesis-block micronucleus cytochrome assay. *Nature Protocols*. 2(5), 1084–1104.
- Fenech, M. (2010). The lymphocyte cytokinesis-block micronucleus cytochrome assay and its application in radiation biodosimetry. *Health Physics*. 98(2), 234–243.
- Fenech, M. (2020). Cytokinesis-block micronucleus cytochrome assay evolution into a more comprehensive method to measure chromosomal instability. *Genes*. 15;11(10):1203.
- Fenech, M., Kirsch-Volders, M., Natarajan, A. T., Surralles, J., Crott, J. W., Parry, J., Norppa, H., Eastmond, D. A., Tucker, J. D., Thomas, P. (2011). Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. *Mutagenesis*. 26(1),125–132.
- Fenech, M., Knasmueller, S., Bolognesi, C., Bonassi, S., Holland, N., Migliore, L., Palitti, F., Natarajan, A. T., Kirsch-Volders, M. (2016). Molecular mechanisms by which in vivo exposure to exogenous chemical genotoxic agents can lead to micronucleus formation in lymphocytes in vivo and ex vivo in humans. *Mutation Research - Reviews in Mutation Research*. (770),12–25.
- Ferrado, J. B., Perez, A. A., Menegon, M., Vaillard, V. A., Gasser, F., Baravalle, M. E., Ortega, H. H., Vaillard, S. E., Santiago, L. G. (2023). PEGylation of genistein-loaded bovine

- serum albumin nanoparticles and its effect on in vitro cell viability and genotoxicity properties. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 222.
- Ferrado, J. B., Perez, A. A., Ruiz, M. C., León, I. E., Santiago, L. G. (2020). Chrysin-loaded bovine serum albumin particles as bioactive nanosupplements. *Food and Function*. 11(7), 6007–6019.
- Firsanov, D., Solovjeva, L., Lublinskaya, O., Zenin, V., Kudryavtsev, I., Serebryakova, M., Svetlova, M. (2017). Rapid detection of γ -H2AX by flow cytometry in cultured mammalian cells. *Methods in Molecular Biology*. (1644), 129–138.
- Fox, R., Aubert, M. (2008). Flow Cytometric Detection of Activated Caspase-3. *Methods in Molecular Biology*. 414:47-56.
- Freire, K., Ordóñez Ramos, F., Soria, D. B., Pabón Gelves, E., Di Virgilio, A. L. (2021). Cytotoxicity and DNA damage evaluation of TiO₂ and ZnO nanoparticles. Uptake in lung cells in culture. *Toxicology Research*. 10(2), 264–271.
- Freshney I. (2010). Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications, Sixth Edition. New York. USA. John Wiley & Sons, Inc. 1, 1-10.
- Freshney, R. I. (2006). *Basic Principles of Cell Culture*. Culture of Cells for Tissue Engineering, ed. G. Vunjak-Novakovic and R.I. Freshney. New York. USA. John Wiley & Sons, Inc. 3–22.
- Fröhlich, E. (2018). Comparison of conventional and advanced in vitro models in the toxicity testing of nanoparticles. *Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology*. 46(2), 1091–1107.
- Frötschl, R. (2015). Experiences with the in vivo and in vitro comet assay in regulatory testing. *Mutagenesis*. 30(1), 51–57.
- Fuchs, R., Stelzer, I., Drees, C. M. P., Rehnolt, C., Schraml, E., Sadjak, A., Schwinger, W. (2012). Modification of the alkaline comet assay with human mesenchymal stem cells. *Cell Biology International*. 36(1), 113–117.
- Genghini, R., Tiranti, I., Bressán, E., Zamorano-Ponce, E., Fernández, J., Dulout, F. (2006). Determination of genotoxicity of classical swine fever vaccine in vitro by cytogenetic and comet tests. *Mutagenesis*. 21(3), 213–217.
- Ghasemi, M., Turnbull, T., Sebastian, S., Kempson, I. (2021). The MTT Assay: Utility, Limitations, Pitfalls, and Interpretation in Bulk and Single-Cell Analysis. *International Journal of Molecular Sciences*. 22(23):12827.
- Ghezzi, P., Jaquet, V., Marcucci, F., Schmidt, H. H. H. W. (2017). The oxidative stress theory of disease: levels of evidence and epistemological aspects. *British Journal of Pharmacology*. 174(12), 1784–1796.
- Gomes, L. M., Moysés, D. A., Nascimento, H. F. S., Mota, T. C., Bonfim, L. T., Cardoso, P. C. S., Burbano, R. M. R., Bahia, M. O. (2021). Genotoxic and cytotoxic effects of the drug dipyrone sodium in African green monkey kidney (Vero) cell line exposed in vitro. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*. 394(7):1529-1535.
- Gong, B., Almasan, A. (2000). Apo2 Ligand/TNF-related Apoptosis-inducing Ligand and Death Receptor 5 Mediate the Apoptotic Signaling Induced by Ionizing Radiation in Leukemic Cells 1. *Cancer Research*. 60(20):5754-60.

- Gorzalczany, S. B., Rodriguez Basso, A. G. (2021). Strategies to apply 3Rs in preclinical testing. *Pharmacology Research and Perspectives*. 9(5): e00863.
- Greek, R., Kramer, L. A. (2019). How to Evaluate the Science of Non-human Animal Use in Biomedical Research and Testing: A Proposed Format for Debate. *Human-Animal Studies*. 22,65–87.
- Grujić, D., Marković, A., Vukajlović, J. T., Stanković, M., Jakovljević, M. R., Ćirić, A., Djordjević, K., Planojević, N., Milutinović, M., Milošević-Djordjević, O. (2020). Genotoxic and cytotoxic properties of two medical plants (*Teucrium arduini* L. and *Teucrium flavum* L.) in relation to their polyphenolic contents. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 852.
- Guo, X., Seo, J. E., Li, X., Mei, N. (2020). Genetic toxicity assessment using liver cell models: past, present, and future. *Journal of Toxicology and Environmental Health - Part B: Critical Reviews*. 23(1),27–50.
- Gyori, B. M., Venkatachalam, G., Thiagarajan, P. S., Hsu, D., Clement, M. V. (2014). OpenComet: An automated tool for comet assay image analysis. *Redox Biology*. 2(1), 457–465.
- Halliwell, B. (2011). Free radicals and antioxidants - Quo vadis?. *Trends in Pharmacological Sciences*. 32(3),125–130.
- Hartung, T. (2009). Toxicology for the twenty-first century. *Nature*. 460(7252), 208–212
- Hartung, T., Maertens, A., Luechtefeld, T. (2024). E-validation – Unleashing AI for Validation. *Altex*. 41(4), 567–587.
- Holmberg, K. (2001). Natural surfactants. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*. 6(2), 148-159.
- Houtgraaf, J. H., Versmissen, J., van der Giessen, W. J. (2006). A concise review of DNA damage checkpoints and repair in mammalian cells. *Cardiovascular Revascularization Medicine*. 7(3), 165–172.
- Hudu, S. A., Alshrari, A. S., Syahida, A., Sekawi, Z. (2016). Cell culture, technology: Enhancing the culture of diagnosing human diseases. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*. 10(3), DE01–DE05.
- Huk, A., Collins, A. R., Yamani, N. El, Porredon, C., Azqueta, A., De Lapuente, J., Dusinska, M. (2015). Critical factors to be considered when testing nanomaterials for genotoxicity with the comet assay. *Mutagenesis*. 30(1),85–88.
- Ibañez, A. E., Coria, L. M., Carabajal, M. V., Delpino, M. V., Risso, G. S., Cobiello, P. G., Rinaldi, J., Barrionuevo, P., Bruno, L., Frank, F., Klinke, S., Goldbaum, F. A., Briones, G., Giambartolomei, G. H., Pasquevich, K. A., Cassataro, J. (2015). A bacterial protease inhibitor protects antigens delivered in oral vaccines from digestion while triggering specific mucosal immune responses. *Journal of Controlled Release*. 220, 18–28.
- Idowu, B., Di Silvio, L. (2013). Principles of good laboratory practice (GLP) for in vitro cell culture applications. *Standardisation in Cell and Tissue Engineering: Methods and Protocols*. 127–147.
- Iturraspe, F., Burgüi, M. de los M., Gutiérrez Fuster, R., Kratje, R., Scorticati, C., Oggero, M. (2025). Host cell impact on pharmacokinetics and neurobiological activity of non-

- erythropoietic hyperglycosylated EPO variants. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 114(9), 103901–103901.
- Jávega., B., Herrera, G., Martínez-Romero, A., O'Connor, J. E. (2023). Flow Cytometry of Oxygen and Oxygen-Related Cellular Stress. *Oxygen*. Vol. 3, Number 2, pp. 222–255.
- Jeggo, P. A., Löbrich, M. (2007). DNA double-strand breaks: Their cellular and clinical impact?. *Oncogene*. 26(56) ,7717–7719.
- Jeong, J. H., Kang, S. H., Kim, J. H., Yu, K. S., Lee, I. H., Lee, Y. J., Lee, J. H., Lee, N. S., Jeong, Y. G., Kim, D. K., Kim, G. H., Lee, S. H., Hong, S. K., Han, S. Y., Kang, B. S. (2014). Protective effects of poly(lactic-co-glycolic acid) nanoparticles loaded with erythropoietin stabilized by sodium cholate against glutamate-induced neurotoxicity. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*. 14(11), 8365–8371.
- Jiang, N., Naz, S., Ma, Y., Ullah, Q., Khan, M. Z., Wang, J., Lu, X., Luosang, D.-Z., Tabassum, S., Chatha, A. M. M., & Basang, W.-D. (2023). An Overview of Comet Assay Application for Detecting DNA Damage in Aquatic Animals. *Agriculture*. 13(3), 623.
- Kalyanaraman, B., Darley-Usmar, V., Davies, K.J., Dennery, P.A., Forman, H.J., Grisham, M.B., Mann, G.E., Moore, K., Roberts, L.J. 2nd, Ischiropoulos, H. (2012). Measuring reactive oxygen and nitrogen species with fluorescent probes: challenges and limitations. *Free Radical Biology and Medicine*. 52(1):1-6.
- Kamiloglu, S., Sari, G., Ozdal, T., Capanoglu, E. (2020). Guidelines for cell viability assays. *Food Frontiers*. 1(3), 332–349.
- Kanaar, R., Hoeijmakers, J.H., van Gent, D.C. (1998). Molecular mechanisms of DNA double strand break repair. *Trends Cell Biology*. 8(12), 483-9.
- Kandárová, H., Letaáiová, S. (2011). Alternative methods in toxicology: Pre-validated and validated methods. *Interdisciplinary Toxicology*. 4(3), 107–113.
- Kato, F. H., Viana, N. I., Santini, C. B., de Souza, C. G. G., Veneziani, R. C. S., Ambrósio, S. R., Tavares, D. C. (2012). Assessment of the in vitro and in vivo genotoxic and antigenotoxic effects of pimaradienoic acid in mammalian cells. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 749(1–2), 87–92.
- Kaufmann, S.H., Lee, S.H., Meng, X.W., Loegering, D.A., Kottke, T.J., Henzing, A.J., Ruchaud, S., Samejima, K., Earnshaw, W.C. (2008). Apoptosis-associated caspase activation assays. *Methods*. 44(3):262-72.
- Kawata, K., Osawa, M., Okabe, S. (2009). In vitro toxicity of silver nanoparticles at noncytotoxic doses to HepG2 human hepatoma cells. *Environmental Science and Technology*. 43(15), 6046–6051.
- Kawai, T., Akira, S. (2010). The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nature Immunology*. 11, 373–384.
- Kehrer, J. P., Klotz, L. O. (2015). Free radicals and related reactive species as mediators of tissue injury and disease: Implications for Health. *Critical Reviews in Toxicology*. 45(9), 765–798.
- Kerr, J. F. R., Wyllie, A. H., Curriet, A. R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer*. 6(4):239-57.

- Kirkland, D., Beevers, C. (2006). Induction of LacZ mutations in MutaTMMouse can distinguish carcinogenic from non-carcinogenic analogues of diaminotoluenes and nitronaphthalenes. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 608(1), 88–96.
- Kirkland, D., Reeve, L., Gatehouse, D., Vanparys, P. (2011). A core in vitro genotoxicity battery comprising the Ames test plus the in vitro micronucleus test is sufficient to detect rodent carcinogens and in vivo genotoxins. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 721(1), 27–73.
- Kirsch-Volders, M., Decordier, I., Elhajouji, A., Plas, G., Aardema, M. J., Fenech, M. (2011). In vitro genotoxicity testing using the micronucleus assay in cell lines, human lymphocytes and 3D human skin models. *Mutagenesis*. 26(1), 177–184.
- Klaunig, J.E., Wang, Z., Pu, X., Zhou, S. (2011). Oxidative stress and oxidative damage in chemical carcinogenesis. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 254(2):86-99.
- Kopp, B., Khoury, L., Audebert, M. (2019). Validation of the γ H2AX biomarker for genotoxicity assessment: a review. *Archives of Toxicology*. 93(8), 2103–2114.
- Kumar, S., Dorstyn, L. (2009). Analysing caspase activation and caspase activity in apoptotic cells. *Methods in Molecular Biology*. 559, 3–17.
- Ladeira, C., Møller, P., Giovannelli, L., Gajski, G., Haveric, A., Bankoglu, E.E., Azqueta, A., Gerić, M., Stopper, H., Cabêda, J., Tonin, F.S., Collins, A. (2024). The Comet Assay as a Tool in Human Biomonitoring Studies of Environmental and Occupational Exposure to Chemicals-A Systematic Scoping Review. *Toxics*. 12(4):270.
- Leist, M., Ghezzi, P., Grasso, G., Bianchi, R., Villa, P., Fratelli, M., Savino, C., Bianchi, M., Nielsen, J., Gerwien, J., Kallunki, P., Larsen, A.K., Helboe, L., Christensen, S., Pedersen, L.O., Nielsen, M., Torup, L., Sager, T., Sfacteria, A., Erbayraktar, S., Erbayraktar, Z., Gokmen, N., Yilmaz, O., Cerami-Hand, C., Xie, Q.W., Coleman, T., Cerami, A., Brines, M. (2004). Derivatives of erythropoietin that are tissue protective but not erythropoietic. *Science*. 305(5681):239-42.
- Leist, M., Hartung, T., Nicotera, P. (2008). The dawning of a new age of toxicology. *ALTEX*. 25(2), 103–114
- Lenz, W. (1962). Thalidomide and congenital abnormalities. *The Lancet*. 279(7219), 45–46.
- Lewis, W., Dalakas, M. C., Erickson, J. D. (2003). Mitochondrial toxicity of antiviral drugs. *Nature Medicine*. 9(4), 417–422.
- Liu, W., Wu, Y., Wang, C., Li, H. C., Wang, T., Liao, C. Y., Cui, L., Zhou, Q. F., Yan, B., Jiang, G. B. (2010). Impact of silver nanoparticles on human cells: Effect of particle size. *Nanotoxicology*. 4(3), 319–330.
- Luo, J., Li, N., Robinson, J. P., Shi, R. (2002). Detection of reactive oxygen species by flow cytometry after spinal cord injury. *Journal Neuroscience Methods*. 120(1):105-12.
- Macdougall, I.C., Roberts, D.E., Coles, G.A., Williams, J.D. (1991). Clinical pharmacokinetics of epoetin (recombinant human erythropoietin). *Clinical Pharmacokinetic*. 20(2):99-113.
- Magnelli, R. F., de Cássia Stocco, R., da Silva Junior, P. I., Mendonça, R. Z. (2021). Evaluation of genotoxic and cytogenetic effects of saponins and aluminum hydroxide adjuvant on viral vaccine. *Journal of Medical Research*. 1(1):102

- Mah, L. J., El-Osta, A., Karagiannis, T. C. (2010). γ H2AX: A sensitive molecular marker of DNA damage and repair. *Leukemia*. 24(4), 679–686.
- Mao, Z., Ke, Z., Gorbunova, V., Seluanov, A. (2012). Replicatively senescent cells are arrested in G1 and G2 phases. *Aging (Albany NY)*. 4(6):431-5.
- Matthews, H. K., Bertoli, C., de Bruin, R. A. M. (2022). Cell cycle control in cancer. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 23(1), 74–88.
- Mattio, M., Ceaglio, N., Oggero, M., Perotti, N., Amadeo, I., Orozco, G., Forno, G., Kratje, R., Etcheverrigaray, M. (2011). Isolation and characterization of a subset of erythropoietin glycoforms with cytoprotective but minimal erythropoietic activity. *Biotechnology Progress*. 27(4), 1018–1028.
- Mazumder, S., Plesca, D., Almasan, A. (2008). *Caspase-3 Activation is a Critical Determinant of Genotoxic Stress-Induced Apoptosis*. *Methods in Molecular Biology*. 414:13-21.
- McBride, W.G. (1961). Thalidomide and congenital abnormalities. *The Lancet*. 278(7216), 1358.
- McKenzie, R., Fried, M.W., Sallie, R., Conjeevaram, H., Di Bisceglie, A.M., Park, Y., Savarese, B., Kleiner, D., Tsokos, M., Luciano, C. (1995). Hepatic failure and lactic acidosis due to fialuridine (FIAU), an investigational nucleoside analogue for chronic hepatitis B. *The New England Journal of Medicine*. 333(17):1099-105.
- Meigs, L., Smirnova, L., Rovida, C., Leist, M., Hartung, T. (2018). Animal Testing and its Alternatives – the Most Important Omics is Economics. *Altex*. 35(3), 275–305.
- Menz, J., Götz, M. E., Gündel, U., Gürtler, R., Herrmann, K., Hessel-Pras, S., Kneuer, C., Kolrep, F., Nitzsche, D., Pabel, U., Sachse, B., Schmeisser, S., Schumacher, D. M., Schwerdtle, T., Tralau, T., Zellmer, S., Schäfer, B. (2023). Genotoxicity assessment: opportunities, challenges and perspectives for quantitative evaluations of dose–response data. *Archives of Toxicology*. 97(9), 2303–2328.
- Mira, A., Gimenez, E.M., Bolzán, A.D., Bianchi, M.S., López-Laraza, D.M. (2013). Effect of thiol compounds on bleomycin-induced DNA and chromosome damage in human cells. *International Archives of Occupational and Environmental Health*. 68(2):107-16.
- Mizuno, C. S., Ampomaah, W., Mendonça, F. R., Andrade, G. C., da Silva, A. M. N., Goulart, M. O., dos Santos, R. A. (2017). Cytotoxicity and genotoxicity of stilbene derivatives in CHO-K1 and HepG2 cell lines. *Genetics and Molecular Biology*. 40(3), 656–664.
- Møller, P. (2006). The alkaline comet assay: Towards validation in biomonitoring of DNA damaging exposures. *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology*. 98 (4),336–345.
- Møller, P., Collins, A., Rodriguez-Garraus, A., Langie, S. A. S., Godschalk, R., Azqueta, A. (2025). Slightly increased level of DNA migration in the comet assay: does statistical significance equal biological significance?. *Mutagenesis*. 24;40(2):99-110.
- Monroy, C. M., Cortés, A. C., Sicard, D. M. (2005). Citotoxicidad y genotoxicidad en células humanas expuestas in vitro a glifosato. *Biomédica*. 25:335-45.
- More, S. J., Bampidis, V., Bragard, C., Halldorsson, T. I., Hernández-Jerez, A. F., Hougaard Bennekou, S., Koutsoumanis, K., Lambré, C., Machera, K., Naegeli, H., Nielsen, S. S., Schlatter, J., Schrenk, D., Turck, D., Younes, M., Aquilina, G., Bignami, M., Bolognesi, C., Crebelli, R., Benford, D. (2021). Guidance on aneugenicity assessment. *EFSA Journal*. 19(8): e06770.

- Mosmann, T. (1983). Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *Journal of Immunological Methods*. 16;65(1-2):55-63.
- Mudry, M. D., Carballo, M. A. (2006). *Genética toxicológica* (1a ed). Buenos Aires. Argentina. Editorial: De Los Cuatro Vientos. 43-49
- Muñoz González, F., Sycz, G., Alonso Paiva, I.M., Linke, D., Zorreguieta, A., Baldi, P.C., Ferrero, M.C. (2019). The BtaF Adhesin Is Necessary for Full Virulence During Respiratory Infection by *Brucella suis* and Is a Novel Immunogen for Nasal Vaccination Against *Brucella* Infection. *Frontiers in Immunology*. 10:1775.
- Mukhopadhyay, P., Rajesh, M., Haskó, G., Hawkins, B.J., Madesh, M., Pacher, P. (2007). Simultaneous detection of apoptosis and mitochondrial superoxide production in live cells by flow cytometry and confocal microscopy. *Nature Protocols*. 2(9):2295-301.
- Navarrete, M. H., Carrera, P., De Miguel, M., De La Torre, C., Spain, S. (1997). A fast comet assay variant for solid tissue cells. The assessment of DNA damage in higher plants. *Mutation Research*. 17;389(2-3):271-7.
- Nikoloff, N., Soloneski, S., Larramendy, M. L. (2012). Genotoxic and cytotoxic evaluation of the herbicide flurochloridone on Chinese hamster ovary (CHO-K1) cells. *Toxicology in Vitro*. 26(1), 157–163.
- Niwa, Y., Iwai, N. (2006). Genotoxicity in Cell Lines Induced by Chronic Exposure to Water-Soluble Fullerenes Using Micronucleus Test. *Environmental Health and Preventive Medicine*. 11(6): 292-7.
- Nohmi, T. (2018). Thresholds of genotoxic and non-genotoxic carcinogens. *Toxicological Research*. 34(4), 281–290
- Odetti, L. M., González, E. C. L., Siroski, P. A., Simoniello, M. F., Poletta, G. L. (2023). How the exposure to environmentally relevant pesticide formulations affects the expression of stress response genes and its relation to oxidative damage and genotoxicity in *Caiman latirostris*. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 97:104014.
- OECD. (2016). Overview of the set of OECD Genetic Toxicology Test Guidelines and updates performed in 2014-2015. *Second edition*, OECD Series on Testing and Assessment, No. 238. OECD Publishing. Paris.
- OECD. (2018). *Guidance Document on Good In Vitro Method Practices: (GIVIMP)*. OECD Series on Testing and Assessment, No. 286. OECD Publishing. Paris.
- OECD. (2023). *Test No. 487: In Vitro Mammalian Cell Micronucleus Test*. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4. OECD Publishing. Paris.
- OECD. (2016). *Test No. 489: In Vivo Mammalian Alkaline Comet Assay*, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4. OECD Publishing. Paris.
- Oggero, J., Gasser, F. B., Zacarías, S. M., Burns, P., Baravalle, M. E., Renna, M. S., Ortega, H. H., Vaillard, S. E., Vaillard, V. A. (2023). PEGylation of Chrysin Improves Its Water Solubility while Preserving the In Vitro Biological Activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 71(49), 19817–19831.
- Oh, M., Yoon, J., Cho, D.Y. (2015). Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Comparison of Two Recombinant Human Erythropoietin Formulations, PDA10 and Eprex, in Healthy

- Korean Male Volunteers: A Randomized, Double-Blinded, Single-Dose, Two-Period Crossover Study. *Clinical Drug Investigation*. 35(10):659-64.
- Olakkaran, S., Kizhakke Purayil, A., Antony, A., Mallikarjunaiah, S., Hunasanahally Puttaswamygowda, G. (2020). Oxidative stress-mediated genotoxicity of malathion in human lymphocytes. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 849:503138.
- Olive, P.L., Banath, J.P. (2006). The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells. *Nature protocols*. 1,23-29.
- Ormerod, M. G. (1998). The study of apoptotic cells by flow cytometry. *Leukemia*. 12(7):1013-25.
- Ormerod, M. G. (2001). Using flow cytometry to follow the apoptotic cascade. *Redox Report*. 6(5), 275–287.
- Osakwe, O. (2016). Preclinical In Vitro Studies: Development and Applicability. *Social Aspects of Drug Discovery, Development and Commercialization*. 129–148.
- Ostling, D. (1984). Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 123(1), 291-298.
- Ott, M., Gogvadze, V., Orrenius, S., Zhivotovsky, B. (2007). Mitochondria, oxidative stress and cell death. *Apoptosis*. 12(5):913-22.
- Pamies, D., Leist, M., Coecke, S., Bowe, G., Allen, D.G., Gstraunthaler, G., Bal-Price, A., Pistollato, F., de Vries, R.B.M., Hogberg, H.T., Hartung, T., Stacey, G. (2022). Guidance document on Good Cell and Tissue Culture Practice 2.0 (GCCP 2.0). *ALTEX*. 39:30-70.
- Pfuhler, S., Kirkland, D., Kasper, P., Hayashi, M., Vanparys, P., Carmichael, P., Dertinger, S., Eastmond, D., Elhajouji, A., Krul, C., Rothfuss, A., Schoening, G., Smith, A., Speit, G., Thomas, C., van Benthem, J., Corvi, R. (2009). Reduction of use of animals in regulatory genotoxicity testing: Identification and implementation opportunities-Report from an ECVAM workshop. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 680(1–2), 31–42
- Phelan, K., May, K. M. (2017). Mammalian cell tissue culture techniques. *Current Protocols in Molecular Biology*. 5:117: A.3F.1-A.3F.23.
- Pistollato, F., Madia, F., Corvi, R., Munn, S., Grignard, E., Paini, A., Worth, A., Bal-Price, A., Prieto, P., Casati, S., Berggren, E., Bopp, S. K., Zuang, V. (2021). Current EU regulatory requirements for the assessment of chemicals and cosmetic products: challenges and opportunities for introducing new approach methodologies. *Archives of Toxicology*. 95(6),1867–1897.
- Poletta, G.L., Mussali-Galante, P., Castillo-Ipiña, J.A., Espinosa-Reyes, G., Flores-Márquez, A.R., González-Mille, D.J., Ilizaliturri-Hernández, C.A., Ruiz de Arcaute, C., Tovar-Sánchez, E., da Silva, J., Franco, D., García, A.L., Lafon-Hughes, L., León-Mejía, G., Narváez, D.M., Pacheco-Pantoja, E.L., Rojas, E., Simoniello, M.F., Soloneski, S., Tirado, N., Yáñez-Estrada, L., Valverde, M., Gómez-Arroyo, S. (2026). LA-COMET group: *In vivo* application of the comet assay in animal and plant models, including wild species. *Mutation Research: Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 912:503943.

- Poteser, M. (2017). Cell-based in vitro models in environmental toxicology: a review. *Biomonitoring*. 4(1), 11-26.
- Prósper, F., Gavira, J. J., Herreros, J., Rábago, G., Luquin, R., Moreno, J., Robles, J. E., & Redondo, P. (2006). Cell transplant and regenerative therapy with stem cells. *Anales del Sistema Sanitario de Navarra*. 29(2) :219-34.
- Pucci, B., Kasten, M., & Giordano, A. (2000). Cell Cycle and Apoptosis. *Neoplasia*. 2(4):291-9.
- Rahmanian, N., Shokrzadeh, M., Eskandani, M. (2021). Recent advances in γ H2AX biomarker-based genotoxicity assays: A marker of DNA damage and repair. *DNA Repair*. 108:103243.
- Redza-Dutordoir, M., Averill-Bates, D. A. (2016). Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*. 1863(12), 2977–2992.
- Ribas, L. E., Baravalle, M. E., Gasser, F. B., Renna, M. S., Addona, S., Ortega, H. H., Savino, G. H., Van de Velde, F., Hein, G. J. (2021). Extraction of phenolic compounds from the shells of pecan nuts with cytotoxic activity through apoptosis against the colon cancer cell line HT-29. *Journal of Food Science*. 86(12), 5409–5423.
- Ribas, L. E., Gasser, F. B., Baravalle, M. E., Renna, M. S., Perello, A., Savino, G. H., Ortega, H. H., Van de Velde, F., Hein, G. J. (2023). Cytotoxic, antioxidant, and cytoprotective properties of polyphenol-enriched extracts from pecan nutshells in MDA-MB-231 breast cancer cells. *Cell Biochemistry and Function*. 41(8), 1442–1450.
- Ribeiro, D., Sousa, A., Nicola, P., Ferreira de Oliveira, J. M. P., Rufino, A. T., Silva, M., Freitas, M., Carvalho, F., Fernandes, E. (2020). β -Carotene and its physiological metabolites: Effects on oxidative status regulation and genotoxicity *in vitro* models. *Food and Chemical Toxicology*. 141:111392.
- Riccardi, C., Nicoletti, I. (2006). Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *Nature Protocols*. 1(3):1458–61
- Rogakou, E. P., Pilch, D. R., Orr, A. H., Ivanova, V. S., Bonner, W. M. (1998). DNA Double-stranded Breaks Induce Histone H2AX Phosphorylation on Serine 139*. *The Journal of Biological Chemistry*. 6;273(10):5858-68
- Rothe, G., Valet, G. (1990). Flow cytometric analysis of respiratory burst activity in phagocytes with hydroethidine and 2',7'-dichlorofluorescein. *Journal of Leukocyte Biology*. 47(5)440–448.
- Russell, W. Burch, R. (1959). The Principles of Humane Experimental Technique. *Universities federation for animal welfare*. 238–238.
- Santacruz Reyes, L., Melo Jimenez, Á., Rodríguez Herrera, J., Moscoso Gama, C. (2017). History of cultured animal cells in vitro and its significance at present. *Biociencias*. 12(2).
- Schütz, C. S., Stope, M. B., Bekeschus, S. (2021). H2A.X Phosphorylation in Oxidative Stress and Risk Assessment in Plasma Medicine. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 13:2021:2060986
- Segeritz, C. P., Vallier, L. (2017). Cell Culture: Growing Cells as Model Systems In Vitro. *Basic Science Methods for Clinical Researchers*. 151–172.

- Shah, K., Moghtaderi, B., Wall, T. (2012). Selection of Suitable Oxygen Carriers for Chemical Looping Air Separation: A Thermodynamic Approach. *Energy & Fuels*. 26(4). 2038–2045.
- Sharma, P., Murthy, P., Bharath, M.M. (2012). Chemistry, metabolism, and toxicology of cannabis: clinical implications. *Iranian Journal of Psychiatry*. 7(4):149-56.
- Shokrzadeh, M., Etebari, M., Ghassemi-Barghi, N. (2020). An engineered non-erythropoietic erythropoietin-derived peptide, ARA290, attenuates doxorubicin induced genotoxicity and oxidative stress. *Toxicology in Vitro*. 66:104864
- Shujaa Edin, H. Y., AL-Haj, N. A., Rasedee, A., Banu Alitheen, N., Abdul Kadir, A., Wun How, C., Sulaiman Rahman, H., AL-Shwyeh, H. A. (2021). Recombinant human Erythropoietin enhanced the cytotoxic effects of tamoxifen toward the spheroid MCF-7 breast cancer cells. *Saudi Journal of Biological Sciences*. 28(9), 5214–5220.
- Simon, H.U., Haj-Yehia, A., Levi-Schaffer, F. (2000). Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction. *Apoptosis*. 5(5):415-8.
- Smart, D. J., Ahmedi, K. P., Harvey, J. S., Lynch, A. M. (2011). Genotoxicity screening via the γH2AX by flow assay. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 715(1–2), 25–31.
- Smart, D. J., Helbling, F. R., Verardo, M., Huber, A., McHugh, D., & Vanscheeuwijck, P. (2020). Development of an integrated assay in human TK6 cells to permit comprehensive genotoxicity analysis *in vitro*. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 849:503129.
- Soloneski, S., Nikoloff, N., Larramendy, M. L. (2016). Analysis of possible genotoxicity of the herbicide flurochloridone and its commercial formulations: Endo III and Fpg alkaline comet assays in Chinese hamster ovary (CHO-K1) cells. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 797, 46–52.
- Sooklert, K., Chattong, S., Manotham, K., Boonwong, C., Klaharn, I. Y., Jindatip, D., Sereemasapun, A. M. (2016). Cytoprotective effect of glutaraldehyde erythropoietin on HEK293 kidney cells after silver nanoparticle exposure. *International Journal of Nanomedicine*. 11, 597–605.
- Štampar, M., Žegura, B. (2024). In vitro hepatic 3D cell models and their application in genetic toxicology: A systematic review. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 900:503835.
- Stebbing, R., Findlay, L., Edwards, C., Eastwood, D., Bird, C., North, D., Mistry, Y., Dilger, P., Liefoghe, E., Cludts, I., Fox, B., Tarrant, G., Robinson, J., Meager, T., Dolman, C., Thorpe, S.J., Bristow, A., Wadhwa, M., Thorpe, R., Poole, S. (2007). Cytokine storm in the phase I trial of monoclonal antibody TGN1412: better understanding the causes. *Journal of Immunology*. 179(5), 3325–3331.
- Steinmetz, K. L., Spack, E. G. (2009). The basics of preclinical drug development for neurodegenerative disease indications. *BMC Neurology*. 12;9 Suppl 1(Suppl 1): S2.
- Suntharalingam, G., Perry, M.R., Ward, S., Brett, S.J., Castello-Cortes, A., Brunner, M.D., Panoskaltsis, N. (2006). Cytokine storm in a phase 1 trial of the anti-CD28 monoclonal antibody TGN1412. *The New England Journal of Medicine*. 355(10), 1018–1028.

- Tarantini, A., Lancelot, R., Mouro, A., Lavault, M. T., Casterou, G., Jarry, G., Hogeveen, K., Fessard, V. (2015). Toxicity, genotoxicity and proinflammatory effects of amorphous nanosilica in the human intestinal Caco-2 cell line. *Toxicology in Vitro*. 29(2), 398–407.
- Telford, W. G. (2018). Multiparametric analysis of apoptosis by flow cytometry. *Methods in Molecular Biology*. Vol. 1678, pp. 167–202.
- Thorpe, T. A. (2007). History of plant tissue culture. *Molecular Biotechnology*. 37(2), 169–180.
- Tice, R. R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J. C., Sasaki, Y. F. (2000). Single cell gel/comet assay: Guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 35(3), 206–221.
- Valdiglesias, V., Giunta, S., Fenech, M., Neri, M., Bonassi, S. (2013). γ H2AX as a marker of DNA double strand breaks and genomic instability in human population studies. *Mutation Research*. 753(1):24-40.
- van Meerloo, J., Kaspers, G. J. L., Cloos, J. (2011). Cell Sensitivity Assays: The MTT Assay. *Cancer Cell Culture*. 237–245.
- Van Norman, G. A. (2019). Limitations of Animal Studies for Predicting Toxicity in Clinical Trials: Is it Time to Rethink Our Current Approach?. *JACC: Basic to Translational Science*. 4(7), 845–854.
- Vargesson, N. (2015). Thalidomide-induced teratogenesis: history and mechanisms. *Birth Defects Research Part C: Embryo Today*. 105(2), 140–156.
- Verma, A., Verma, M., Singh, A. (2020). Animal tissue culture principles and applications. *Animal Biotechnology*. 269–93.
- Vermes, I., Haanen, C., Steffens-Nakken, H., Reutelingsperger, C. (1995). A novel assay for apoptosis Flow cytometric detection of phosphatidylserine early apoptotic cells using fluorescein labelled expression on Annexin V. *Journal of Immunological Methods*. 184(1). 39-51.
- Vidya, G., Gladwin, V., Chand, P. (2015). A comprehensive review on clinical applications of comet assay. In *Journal of Clinical and Diagnostic Research*. 9(3), GE01–GE05.
- Visentini, F. F., Perez, A. A., Baravalle, M. E., Renna, M. S., Ortega, H. H., Santiago, L. G. (2020). *In vitro* gastrointestinal digestion and cytotoxic effect of ovalbumin-conjugated linoleic acid nanocomplexes. *Food Research International*. (137), 109381.
- von Aulock, S., Busquet, F., Locke, P., Herrmann, K., Hartung, T. (2022). Engagement of Scientists with the Public and Policymakers to Promote Alternative Methods. *Altex*. 39(4), 543–559.
- Walker, N. P. C., Talanian, R. V., Brady, K. D., Dang, L. C., Bump, N. J., Ferenz, C R, Franklin, S., Ghayur, T., Hackett, M. C., Hammill, L. D., Herxog, L., Hugunin, M., Houy, W., Mankovich, J. A., McGuinness, L., Orlewicz, E., Paskind, M, Pratt, C. A., Reis, P., Wongt, W. W. (1994). Crystal Structure of the Cysteine Protease Interleukin-1 P-Converting Enzyme: A (p20/pl O)* Homodimer. *Cell*. 29;78(2), 343-52.
- Wang, K., Ma, J. Y., Li, M. Y., Qin, Y. S., Bao, X. C., Wang, C. C., Cui, D. L., Xiang, P., & Ma, L. Q. (2021). Mechanisms of Cd and Cu induced toxicity in human gastric epithelial cells:

- Oxidative stress, cell cycle arrest and apoptosis. *Science of the Total Environment*. 20:756:143951.
- Wani, A. K., Akhtar, N., Mir, T. ul G., Singh, R., Jha, P. K., Mallik, S. K., Sinha, S., Tripathi, S. K., Jain, A., Jha, A., Devkota, H. P., Prakash, A. (2023). Targeting Apoptotic Pathway of Cancer Cells with Phytochemicals and Plant-Based Nanomaterials. *Biomolecules*. 18; 13(2):194.
- Weiskirchen, S., Schröder, S.K., Buhl, E.M., Weiskirchen, R. (2023). A Beginner's Guide to Cell Culture: Practical Advice for Preventing Needless Problems. *Cells*.12(5):682.
- WHO/FAO. (2020). *Chapter 4: Hazard Identification and Characterization: Toxicological and Human Studies. Section 4.5 Genotoxicity. Environmental Health Criteria*. <http://www.inchem.org/>.
- Williams, D. P., Shipley, R., Ellis, M. J., Webb, S., Ward, J., Gardner, I., Creton, S. (2013). Novel in vitro and mathematical models for the prediction of chemical toxicity. *Toxicology Research*. 2(1), 40–59.
- Wills, J. W., Johnson, G. E., Doak, S. H., Soeteman-Hernández, L. G., Slob, W., White, P. A. (2016). Empirical analysis of BMD metrics in genetic toxicology part I: *In vitro* analyses to provide robust potency rankings and support MOA determinations. *Mutagenesis*. 31(3), 255–263.
- Wilson, K. P., Black, J. F., Thomson, J. A., Kim, E. E., Griffith, J. P., Navia, M. A., Murcko, M. A., Chambers, S. P., Aldape, R. A., Raybuck, S. A., Livingston, D. J. (1994). *Structure and mechanism of interleukin-1B converting enzyme*. *Nature*. 370(6487):270-5.
- Winterbourn, C.C. (2014). The challenges of using fluorescent probes to detect and quantify specific reactive oxygen species in living cells. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1840(2):730-8.
- Winterbourn, C. C. (2015). Are free radicals involved in thiol-based redox signaling? *Free Radical Biology and Medicine*. 80, 164–170.
- Wogan, G. N., Hecht, S. S., Felton, J. S., Conney, A. H., Loeb, L. A. (2004). Environmental and chemical carcinogenesis. *Seminars in Cancer Biology*. 14(6), 473–486.
- Xu, X., Lai, Y., Hua, Z. C. (2019). Apoptosis and apoptotic body: Disease message and therapeutic target potentials. *Bioscience Reports*. 39(1): BSR20180992.
- Ye, C. J., Sharpe, Z., Alemara, S., Mackenzie, S., Liu, G., Abdallah, B., Horne, S., Regan, S., & Heng, H. H. (2019). Micronuclei and genome chaos: Changing the system inheritance. *Genes*. 10(5), 366.
- Youle, R. J., Strasser, A. (2008). The BCL-2 protein family: Opposing activities that mediate cell death. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 9(1), 47–59.
- Zeiger, E. (2010). Genetic Toxicology Testing. *Comprehensive Toxicology, Second Edition*. Ed. Lamb, J., Elsevier/Academic Press, Oxford. (3),139–158.
- Zhang, T. T., Zhao, G., Li, X., Xie, F. W., Liu, H. M., Xie, J. P. (2015). Genotoxic and oxidative stress effects of 2-amino-9H-pyrido[2,3-b]indole in human hepatoma G2 (HepG2) and human lung alveolar epithelial (A549) cells. *Toxicology Mechanisms and Methods*. 25(3), 212–222.

- Zhao, C. (2023). Cell culture: in vitro model system and a promising path to in vivo applications. *Journal of Histotechnology*. 46(1),1–4.
- Zhou, Q. M., Wang, X. F., Liu, X. J., Zhang, H., Lu, Y. Y., Su, S. B. (2011). Curcumin enhanced antiproliferative effect of mitomycin C in human breast cancer MCF-7 cells in vitro and in vivo. *Acta Pharmacologica Sinica*. 32(11), 1402–1410.
- Zielonka, J., Kalyanaraman, B. (2010). Hydroethidine- and MitoSOX-derived red fluorescence is not a reliable indicator of intracellular superoxide formation: another inconvenient truth. *Free Radical Biology and Medicin*. 48(8):983-1001.
- Zurita-Cruz, J. N., Barbosa-Cortés, L., Villasís-Keever, M. Á. (2019). From research to practice: Clinical phases for drug development. *Revista Alergia Mexico*. 66(2), 246–253.