

Estado de la publicación: El preprint no ha sido enviado para publicación

# Evaluación preliminar de la citotoxicidad dependiente del pH en el Co-Cultivo HTB-125 / HTB-126 tratado con Ascorbato de Potasio con Ribosa o Ribosato de Potasio

María Gabriela Sánchez-Vega, Guido Paoli, Covadonga González Lazcano

<https://doi.org/10.1590/SciELOPreprints.13618>

Enviado en: 2025-10-02

Postado en: 2025-10-17 (versión 1)

(AAAA-MM-DD)

La moderación de este preprint recibió lo/s endoso/s de:

- Luca BRUNI (ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3710-3399>)

## ***Evaluación preliminar de la citotoxicidad dependiente del pH en el Co-Cultivo HTB-125 / HTB-126 tratado con Ascorbato de Potasio con Ribosa o Ribosato de Potasio***

**María Gabriela Sánchez-Vega**<sup>1</sup> ORCID: <https://orcid.org/0009-0005-7661-6199>

**Guido Paoli**<sup>1,2</sup> ORCID: <https://orcid.org/0009-0009-3977-4226>

**Covadonga González Lazcano**<sup>1</sup> ORCID: <https://orcid.org/0009-0002-8708-5491>

<sup>1</sup>Biochemical Research A.E.I.E., Noreña, Asturias, España.

<sup>2</sup>Fundación Valsé Pantellini para la investigación y el estudio de las enfermedades degenerativas, Oviedo, Asturias, España.

### **RESUMEN**

En nuestro Laboratorio hemos logrado implantar un modelo de Co-Cultivo compuesto por Hs 578Bst (HTB-125 epitelial sana) y Hs 578T (HTB-126 epitelial tumoral triple negativo, ATCC® No. TCP-1002TM, derivada de un carcinoma mamario). Este modelo de células en colonización activa que hemos diseñado nos ha permitido evidenciar cómo puede afectar el pH en la fortaleza de la matriz extracelular y ver la respuesta variable del Ascorbato de Potasio con Ribosa y del Ribosato de Potasio sobre éste, demostrando la indiscutible la importancia de mantener el pH alcalinizado mediante el uso del exceso de bicarbonato de potasio de nuestras formulaciones para combatir a la línea celular HTB126 triple negativo, y así poder garantizar un mejor efecto citotóxico antitumoral.

### **Palabras-clave:**

Microambiente, tumoral, Ascorbato, Ribosato, Potasio, pH.

## ***A preliminary evaluation of the impact of pH on cytotoxicity when HTB-125/HTB-126 is co-cultured and treated with Potassium Ascorbate and Ribose or Potassium Riboside***

**María Gabriela Sánchez-Vega**<sup>1</sup> ORCID: <https://orcid.org/0009-0005-7661-6199>

**Guido Paoli**<sup>1,2</sup> ORCID: <https://orcid.org/0009-0009-3977-4226>

**Covadonga González Lazcano**<sup>1</sup> ORCID: <https://orcid.org/0009-0002-8708-5491>

<sup>1</sup>Biochemical Research A.E.I.E., Noreña, Asturias, Spain.

<sup>2</sup>Fundación Valsé Pantellini for the research and study of degenerative diseases, Oviedo, Asturias, Spain.

### **SUMMARY**

In our laboratory we have managed to implement a co-culture model composed of Hs 578Bst (HTB-125 healthy epithelial) and Hs 578T (HTB-126 triple negative tumor epithelial, ATCC® No. TCP-1002TM, derived from breast carcinoma). This model of cells in active colonization that we have designed has allowed us to show how pH can affect the strength of the extracellular matrix and see the variable response of Potassium Ascorbate with Ribose and Potassium Riboside on it, demonstrating the indisputable importance of maintaining the alkalized pH by using the excess potassium bicarbonate of our formulations to combat the triple negative HTB126 cell line, and thus be able to guarantee a better cytotoxic antitumoral effect.

### **Keywords: European Commission**

Microenvironment, tumoral, ascorbate, ribosate, potassium, pH.

## 1. Introducción

Sabemos que las interacciones entre las células madre de cáncer (CMCs) y el microambiente tumoral contribuyen al mantenimiento y enriquecimiento de las primeras. Por ello, en los últimos años se han desarrollado modelos celulares, con el fin de simular *ex vivo* las interacciones entre las células tumorales y su nicho. Estos modelos han demostrado numerosas ventajas frente a los tradicionales cultivos, sobre todo en cuanto a su respuesta ante agentes quimioterapéuticos. Se trata de sistemas de cultivo *in vitro* que imitan algunas de las condiciones espaciales, la heterogeneidad celular y las redes moleculares del microambiente tumoral, y suponen una esperanzadora herramienta para dilucidar la fisiopatología de las CMCs y diseñar nuevas modalidades de tratamiento clínicamente relevantes [1].

El microambiente tumoral es el entorno local con el que las células interactúan mediante señales químicas y físicas, dentro de un tumor. Se trata de un medio complejo que incluye células madre del cáncer, células del grueso tumoral, células inmunitarias, células del tejido conjuntivo, y también células endoteliales de los vasos sanguíneos que rodean y alimentan el tumor. Encontramos otros elementos, como la matriz extracelular (ECM), factores de crecimiento, citoquinas, nervios y músculo liso [2]. Las complejas redes de señalización intercelular entre las CMCs y los demás constituyentes del nicho modulan las vías de señalización intracelular de las primeras, de forma que promueven el crecimiento, el mantenimiento y la diferenciación de las CMCs.

Considerando las características que hemos descrito para el microambiente tumoral las acciones que se pueden llevar a cabo tras pasar las limitaciones de la cirugía, la quimioterapia y la radioterapia, serían las siguientes: promover una proliferación controlada, restablecer apoptosis y senescencia programadas, armonizar la respuesta inmune, inhibir la angiogénesis anormal, inhibir la invasión y la metástasis y sobre todo evitar un ambiente proinflamatorio [3]. Estas acciones en muchos casos han podido ejercerse mediante la administración de una serie de nutrientes o sustancias fisiológicas con propiedades anticancerígenas, que han demostrado ser eficaces *in vivo* e *in vitro*. Además, muchas de ellas tienen propiedades antioxidantes que permiten proteger las células sanas de los adversos de terapias secundarias [4].

En este camino continuando con la investigación del microambiente tumoral tomamos como base el modelo de Co-Cultivo HTB(125/126) desarrollado por la Biochemical Research A.E.I.E. [5] que evidencia claramente entre estas dos líneas celulares todas las características que lo representan. De forma de poder utilizarlo en la evaluación preliminar de la citotoxicidad al variar el pH cuando se utilizan los tratamientos con Ascorbato de Potasio con Ribosa o Ribosato de Potasio (RCK o RK) como sustancias antitumorales (Estas estructuras llevan varios años en estudio por la Biochemical Research A.E.I.E., en colaboración con la Fundación Valsé Pantellini, sobre la base de los estudios del bioquímico italiano Gianfrancesco Valsé Pantellini en la segunda mitad del siglo pasado y publicados entre 1970 y 1999 [6-12]).

Usando este modelo junto a los resultados obtenidos en él con anterioridad [5] y basándonos en que este ambiente está lleno de tensión para las células normales (sanas) que viven a su alrededor. El objetivo principal de nuestra investigación es evaluar el impacto de trabajar a diferentes valores de pH en el modelo de Co-Cultivo HTB125-126 (Co-CpH) tratado con RCK o RK sobre la eficiencia del efecto antitumoral de estas moléculas.

## **Objetivos**

- 1.1** Determinar la influencia del pH y de la Relación molar 1:2 de Vitamina C y Ribosa con respecto al Bicarbonato de Potasio en RCK y RK, sobre su efecto en las Células HTB126 Y HTB125 como ensayo preliminar al estudio del Co-Cultivo pH HTB125-126 con variación de pH.
- 1.2** Evaluar sobre el modelo de microambiente tumoral implementado por el Co-Cultivo pH HTB(125/126) durante un periodo de 144h y en tres medios/pH diferentes: A, B y C; mediante ensayo espectrofotocolorimétrico Ultravioleta Visible y conteo celular, en este último utilizando una cámara de Bürker como instrumento de conteo analítico cuantitativo, las posibles señales o cambios que deriven después de tratar con Ascorbato de Potasio con Ribosa 42,6 mM y con Ribosato de Potasio 125mM de forma independiente (RCK, RK, en agua de formulación oral de norma FARMACOPEA vigente GUINAMA) frente a ambos metabolismos activos de estas líneas celulares mencionadas.
- 1.3** Evaluar sobre el Co-Cultivo pH HTB(125/126) la variación del parámetro de control fisicoquímico pH, la tinción PAS sobre los cultivos fijados y la expresión del estrés oxidativo mediante el test de NADPH en todas las condiciones y tiempos de ensayo.

## **3. Materiales y métodos**

### **3.1 Materiales**

En el desarrollo de todos los experimentos llevados a cabo se han utilizado dos líneas celulares distintas que se obtuvieron en American Type Culture Collection (ATCC): Hs 578Bst (HTB-125 epitelial sana) y Hs 578T (HTB-126 epitelial tumoral triple negativo , ATCC® No. TCP-1002TM, derivada de un carcinoma mamario). En una primera parte se trabajaron de forma individual y en otra parte se utilizaron en conjunto para la formación del Co-Cultivo HTB(125/126). Para el mantenimiento y expansión de la células fue necesario trabajar en condiciones de esterilidad, para el crecimiento de estas líneas celulares se utilizaron tres medios de cultivo que se describen a continuación hasta fin de ensayo:

Los medios de cultivos para el ensayo del Co-Cultivo HTB125-126 se describen a continuación: El buffer pH $\mathbf{B}$  fue preparado de la misma forma indicada por ATCC para el medio HybriCare en células sanas epiteliales mamaria en crecimiento (Medio HybriCare complementado con 10% SFB-suero fetal bovino sin inactivar por calor, 1% de antibiótico -Penicilina/Estreptomina y 0,3% de EGF-factor de crecimiento epitelial). El buffer pH $\mathbf{A}$  fue preparado igual que el pH $\mathbf{B}$  con la variación de que se reemplazó el Bicarbonato de sodio por buffer PIPES (10mM) y se ajustó el pH con HCl o NaOH según la necesidad. Finalmente, el buffer pH $\mathbf{C}$  fue preparado con la misma base que pH $\mathbf{A}$  y pH $\mathbf{B}$ , usando en este caso buffer HEPES 10mM y ajustando el pH final de la forma antes indicada en pH $\mathbf{A}$ .

### **3.2 Tratamientos**

**3.2.1 Ensayo para determinar la proliferación celular de las líneas celulares HTB126 y HTB125 tratadas (cada 48h) y no tratadas (control) con RCK y RK durante un período de 6 días en los tres medio pH $\mathbf{A}$ , pH $\mathbf{B}$  y pH $\mathbf{C}$ ; y durante un período de 12 días en el medio B.**

Datos de las concentraciones de las soluciones de stock de los tratamientos y sus concentraciones finales en cada ensayo, las cuales se establecieron bajo la relación molar 1:2 entre D-(-)-Ribosa (R) o Ácido L-(+)-Ascórbico (C) con el bicarbonato de potasio (se elimina el exceso de  $\text{KHCO}_3$  (K) con esta relación molar) y también debe mantenerse como base de stock de potasio 150mM para ambos casos, **RCK** y **RK**. Las concentraciones finales están limitadas por la cristalización del tratamiento en los cultivos celulares. Esto implica que:

#### **RK**

150mg D-(-)-Ribosa	mM stock/final 75,2/5
200mg $\text{KHCO}_3$	mM stock/final 150/10
13,3 ml $\text{H}_2\text{O}$ (GUINAMA de formulación oral de Farmacopea vigente)	

#### **RCK**

176mg Ácido L-(+)-Ascórbico	mM stock/final 75,2/1,42
3mg D-(-)-Ribosa	$\mu\text{M}$ stock/final 75/1,5
200mg $\text{KHCO}_3$	mM stock/final 150/3
13,3 ml $\text{H}_2\text{O}$ (GUINAMA de formulación oral de Farmacopea vigente)	

### **3.2.2 Co-Cultivo pH HTB(125/126) para RCK.**

**Tratamiento: Suministrado por Biochemical Research A.E.I.E.** Ascorbato de Potasio con Ribosa (**RCK**) 42,6mM de stock, **concentración final** en pocillo de **1,42mM**.

#### **RCK**

50mg L-(+)-Ácido ascórbico	
1mg D-(-)-Ribosa	mM stock/final 42,6/1,42
100mg $\text{KHCO}_3$	Reactivo limite L-(+)-Ácido ascórbico
6,67 ml $\text{H}_2\text{O}$ (GUINAMA de formulación oral de Farmacopea vigente)	

Datos de la concentración de la solución de stock del tratamiento con RCK con una relación molar 1:3 entre el L-(+)-Ácido ascórbico con el bicarbonato de potasio. La concentración final está limitada por la cristalización del tratamiento en los cultivos celulares.

Tratamiento: (**RCK**) RCK 42,6mM en Agua GUINAMA de formulación oral.

Control celular: (**CC**) El cual fue tratado con la misma cantidad que la utilizada para el tratamiento, pero en su lugar se colocó agua GUINAMA sola.

### **3.2.3 Co-Cultivo pH HTB(125/126) para RK.**

**Tratamiento: Suministrado por Biochemical Research A.E.I.E.** Ribosato de Potasio (**RK**) 125mM de stock, **concentración final** en pocillo de **5mM**.

#### **RK**

50mg D-(-)-Ribosa	mM stock/final 125/5
120mg $\text{KHCO}_3$	Reactivo limite D-(-)-Ribosa
2,67 ml $\text{H}_2\text{O}$ (GUINAMA de formulación oral de Farmacopea vigente)	

Datos de la concentración de la solución de stock del tratamiento con RK con una relación molar 1:3,5 entre D(-)-Ribosa con el bicarbonato de potasio. La concentración final está limitada por la cristalización del tratamiento en los cultivos celulares.

Tratamiento: **(RK)** RK 125mM en Agua GUINAMA de formulación oral.

Control celular: **(CC)** El cual fue tratado con la misma cantidad que la utilizada para el tratamiento, pero en su lugar se colocó agua GUINAMA sola.

### 3.3 Métodos

Las líneas celulares tumorales y sanas se cultivaron en monocapa hasta tener la cantidad y confluencia necesaria para realizar los experimentos. La duplicación y mantenimiento de las células en todos los casos se trabajó con cambio de medio cada 48h y para la aplicación del tratamiento al Co-Cultivo pH HTB125/126 se utilizó un tiempo de cada 48h para el Ascorbato de Potasio con Ribosa **(RCK)** 42,6mM de stock y 24h para el Ribosato de Potasio **(RK)** 125mM de stock. La variación del parámetro de control fisicoquímico pH, en todas las condiciones y tiempos de ensayo (ambas líneas celulares), se realizó mediante medida directa con pHmetro digital de electrodo micro. La medida para determinar las células vivas y muertas se realizó mediante la tinción con Azul Tripán (colorante que penetra únicamente en las células cuya membrana esta dañada coloreándolas de azul oscuro indicando que estas están muertas y las vivas no se colorean con la tinción) realizando el conteo celular mediante el uso de la cámara de Bürker, con un n de 3 para su reproducibilidad.

Se estudió de forma cualitativa la morfología [5] de las células a través de su visualización y captura de imagen mediante microscopia reversa, teñidas y sin teñir (microscopio Leica i8). La tinción que se utilizó para visualizar con más detalle las fotos realizadas ante el microscopio de forma cualitativa fue la tinción PAS (P, ácido periódico + reactivo Schiff). Y de forma cuantitativa la actividad de estrés oxidativo mediante la prueba de NADPH que mide la cantidad de peróxido de hidrógeno producido.

#### 3.3.1 Proliferación celular de las líneas celulares HTB126 y HTB125 tratadas (cada 48h) y no tratadas (control) con RCK y RK durante un período de 6 días en los tres medio pH<sub>A</sub>, pH<sub>B</sub> y pH<sub>C</sub>; y durante un período de 12 días en el medio B.

Las células fueron sembradas 24 horas antes a su primer tratamiento en placas de 96 pocillos a una concentración inicial de 5000 cel HTB125/ml (para ambos tratamientos en células epiteliales mamarias sanas) y de 5000 y 8000 cel HTB126/ml para los tratamientos RK y RCK respectivamente (células epiteliales triple negativo tumorales). Estas concentraciones fueron determinadas utilizando una cámara de Bürker para el conteo celular. La actividad proliferativa de los compuestos RCK y RK utilizados cada 48h fue evaluada usando la aplicación del Kit comercial de Sigma-Aldrich Cell Counting WST-8 sal de Tetrazolio (CCK8). La base de esta técnica consiste en que la sal de tetrazolio es reducida por la deshidrogenasa celular a un producto de color naranja denominado formazan que es soluble en los medios de cultivo celulares. La cantidad de formazan producido es directamente proporcional al número de células vivas y se determina midiendo la absorbancia a 450nm con una longitud de referencia a 620nm como lo establece el protocolo comercial (se establecen blancos y controles en cada condición). Los controles celulares fueron realizados en las mismas condiciones de

crecimiento que las células tratadas y recibieron la misma cantidad utilizada para el tratamiento, pero de solvente solo (agua Guinama) de forma que las diferencias asociadas correspondan a el efecto de los tratamientos.

Se trabajó bajo 3 condiciones a pH diferentes de medios de cultivo para cada ensayo:

#### pH finales para cada buffer preparado

pH A	pH B	pH C
buffer PIPES pH 6,38	buffer NaHCO <sub>3</sub> pH 7,40	buffer HEPES pH 8,12

(indicador de pH rojo fenol)

#### 3.3.2 Co-Cultivo pH HTB(125/126) para RCK

##### Sistemas de disposición celular y medios de cultivos utilizados:

**Hs 578Bst (HTB125 epitelial sana) y Hs 578T (HTB126 epitelial tumoral triple negativo , ATCC® No. TCP-1002TM, derivada de un carcinoma mamario)**

Cada línea celular fue mantenida en sus medios de cultivos correspondientes hasta el día cero del ensayo en incubadoras diferentes para cada línea celular. Posteriormente al alcanzar la confluencia adecuada para el ensayo se trataron con Tripsina-EDTA para su disposición final. Los valores en porcentaje de la línea celular HTB125 con respecto a la línea celular HTB126 en el Co-Cultivo pH es de 85% y 15% respectivamente, utilizando dos sistemas Placas de 24 pocillos para los ensayos donde se evalúa la tinción PAS y la prueba de NADPH para el estrés oxidativo (volumen final de pocillo 0,8 ml); y placas de 96 pocillos para la prueba de proliferación celular espectrofotocolorimétrico con el Kit cell counting CCK8 de Sigma Aldrich (volumen final de pocillo 0,2 ml). En ambos sistemas se evaluaron 3 tiempos 48, 96 y 144 horas

Se trabajó bajo 3 condiciones a pH diferentes de medios de cultivo para cada ensayo:

#### pH finales para cada buffer preparado

pH A	pH B	pH C
buffer PIPES pH 6,38	buffer NaHCO <sub>3</sub> pH 7,40	buffer HEPES pH 8,12

(indicador de pH rojo fenol)

#### 3.3.3 Co-Cultivo pH HTB(125/126) para RK

##### Sistemas de disposición celular y medios de cultivos utilizados:

**Hs 578Bst (HTB125 epitelial sana) y Hs 578T (HTB126 epitelial tumoral triple negativo , ATCC® No. TCP-1002TM, derivada de un carcinoma mamario)**

Cada línea celular fue mantenida en sus medios de cultivos correspondientes hasta el día cero del ensayo en incubadoras diferentes para cada línea celular. Posteriormente al alcanzar la confluencia adecuada para el ensayo se trataron con Tripsina-EDTA para su disposición final. Los valores en porcentaje de la línea celular HTB125 con respecto a la línea celular HTB126 en el Co-Cultivo pH es de 85% y 15% respectivamente, utilizando dos sistemas Placas de 24 pocillos para los ensayos donde se evalúa la tinción PAS y la prueba de NADPH para el estrés oxidativo (volumen final de pocillo 0,8 ml); y placas de 96 pocillos para la prueba de proliferación celular espectrofotocolorimétrico con el Kit cell counting CCK8 de Sigma Aldrich (volumen final de pocillo 0,2 ml). En ambos sistemas se evaluaron 3 tiempos 48, 96 y 144 horas.

Se trabajó bajo 3 condiciones a pH diferentes de medios de cultivo para cada ensayo:

#### pH finales para cada buffer preparado

pH A	pH B	pH C
buffer PIPES pH 6,38	buffer NaHCO <sub>3</sub> pH 7,40	buffer HEPES pH 8,12

(indicador de pH rojo fenol)

### 3.3.4 Evaluaciones de los ensayos

#### Tinción PAS en células del Co-CpH HTB125-126

Cuando evaluamos tinciones es imprescindible determinar el carácter general de la información que ofrece dicha tinción, en este caso debemos tener en cuenta que en todas las células animales están presentes Glicoproteínas acídicas, localizadas fuera de la superficie de la membrana plasmática. Cuando las células reciben un estímulo inmunitario adaptativo producen más Glicoproteínas, esta respuesta puede verse estimulada por una alta dismutación de peróxido de hidrogeno, hecho que puede ser generado por el suministro de suplementos antioxidantes en algunos casos. En consecuencia, aumenta la eficiencia del sistema inmunitario por la activación de los sistemas enzimáticos de defensa, protegiendo así a las células contra el estrés oxidativo. Es importante resaltar que las condiciones pH B y pH C mantienen un pH fisiológico hacia la alcalinización, en estos valores se estimula la producción de glicoproteínas y se aberturan los canales proteicos para dar entrada con mayor facilidad a los iones potasio suministrados, los cuales se caracterizan por transportarse a través de estos canales proteicos al interior de la célula.[13]

#### Prueba de NADPH para medir el estrés oxidativo en células del Co-CpH HTB125-126

En esta prueba se ha utilizado el protocolo de NADPH en el cual la muestra celular se trata con Buffer Tris-HCl con EDTA a pH8, mas NADPH 2,4 mM (37°C/10minutos) y posteriormente se adiciona Terbutilhidroperóxido 30mM como activador, esta reacción es medida durante 90 segundos a 340nm. Esta absorbancia que se genera es medida e indica la cantidad de peróxido de hidrogeno producido, este procedimiento se aplica a las muestras tratadas y a cada control. A mayor concentración de peróxido de hidrogeno por célula, el sistema de defensa enzimático se ve disminuido ante un proceso de estrés oxidativo pudiéndose comparar entre todas las condiciones del ensayo.[14]

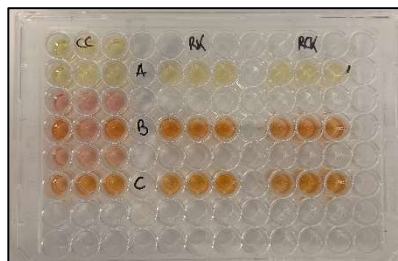
#### Proliferación y Mortalidad del Co-CpH HTB125-126

Para llevar a cabo este conteo celular se realizó la tripsinización (mediante protocolos habituales en biología molecular) de las células de los pocillos escogidos y también se recogieron sus respectivos sobrenadantes, esto con el fin de evaluarlos de igual modo y tener una cantidad de células más precisa en cada condición del ensayo. Estas células se resuspendieron en medio de cultivo limpio y una alícuota representativa y homogenizada se tiñó con azul tripán para diferenciar células vivas de muertas tanto del pellet como del sobrenadante. Utilizando una cámara de Bürker se contaron las células vivas del pellet y del sobrenadante, y también se contaron las células muertas del sobrenadante, obteniendo así un numero específico de células para cada condición.[15]

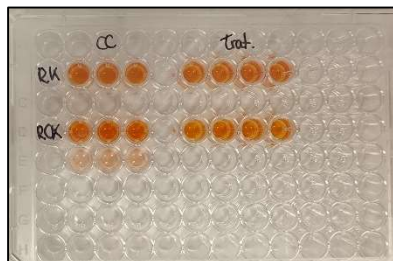
## Discusión y Resultados Experimentales

**4.1 Resultados Experimentales. Proliferación celular de las líneas celulares HTB126 y HTB125 tratadas (cada 48h) y no tratadas (control) con RCK y RK durante un período de 6 días en los tres medio pHA, pHB y pH; y durante un período de 12 días en el medio B.**

### 4.1.1 Línea celular HTB125 epitelial Sana



Ensayo 6 días

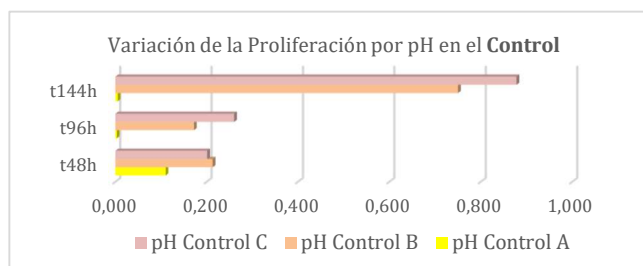


Ensayo hasta 12 días

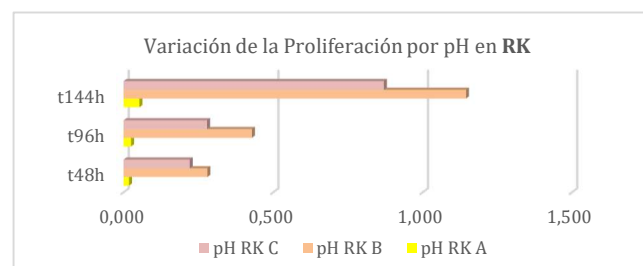
## VARIACIÓN DE LA PROLIFERACIÓN DE LAS CELULAS HTB125 CON 3 VALORES DIFERENTES DE pH FRENTE A RK Y RCK

Variación de la Proliferación celular de HTB125 en Absorbancias en cada condición de pH

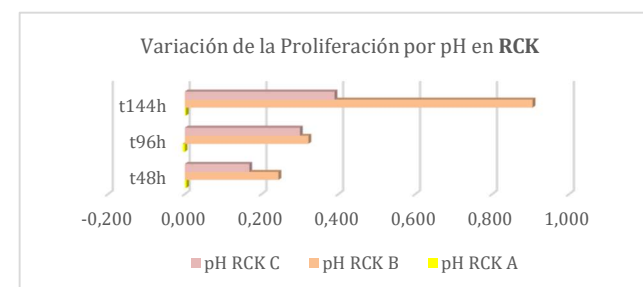
Tiempo	t48h	t96h	t144h
pH Control A	0,110	0,003	0,005
pH Control B	0,213	0,172	0,750
pH Control C	0,201	0,260	0,878

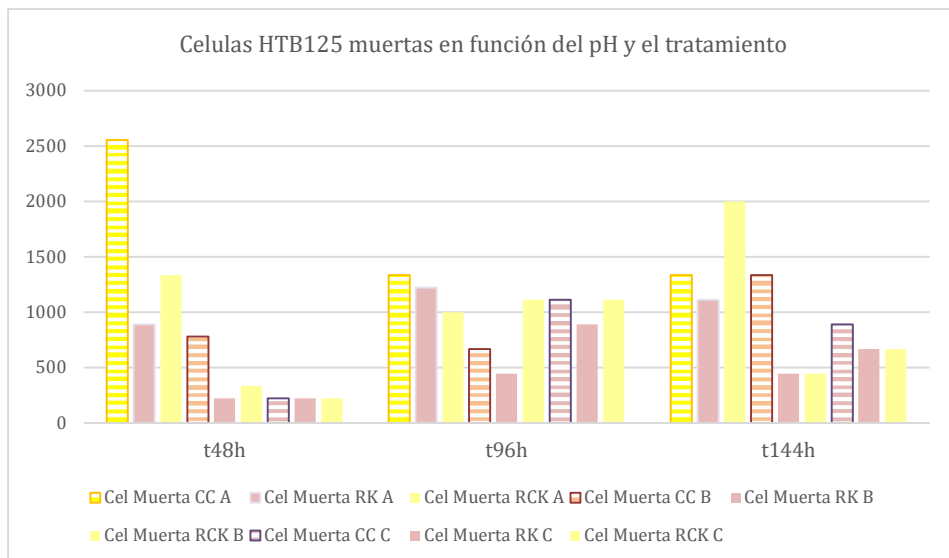


Tiempo	t48h	t96h	t144h
pH RK A	0,018	0,025	0,053
pH RK B	0,280	0,429	1,145
pH RK C	0,221	0,279	0,870



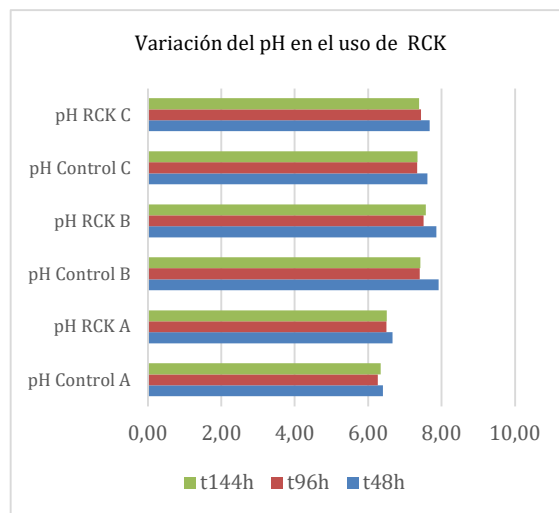
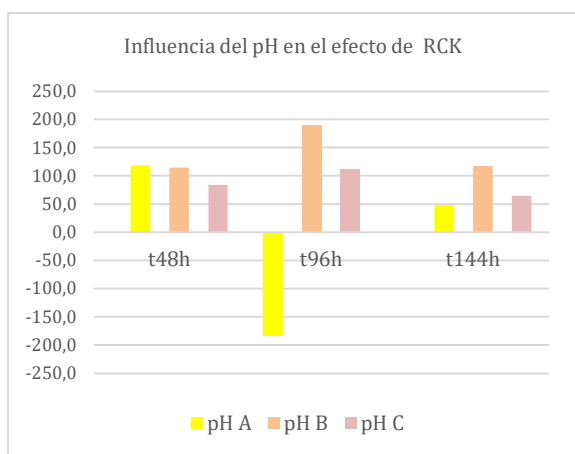
Tiempo	t48h	t96h	t144h
pH RCK A	0,004	-0,006	0,003
pH RCK B	0,244	0,322	0,905
pH RCK C	0,168	0,300	0,390





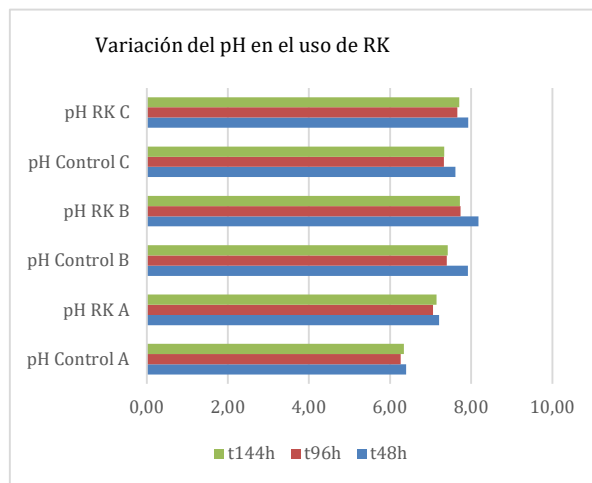
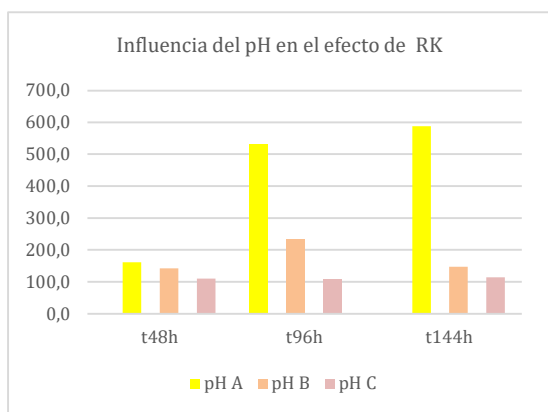
Tiempo	RCK Proliferación%		
	t48h	t96h	t144h
<b>pH A</b>	118,2	-183,0	48,1
<b>pH B</b>	114,6	189,2	117,5
<b>pH C</b>	83,6	112,3	64,5

Tiempo	RCK VALORES DE pH		
	t48h	t96h	t144h
<b>pH Cont. A</b>	6,40	6,26	6,34
<b>pH RCK A</b>	6,66	6,50	6,51
<b>pH Cont. B</b>	7,92	7,40	7,42
<b>pH RCK B</b>	7,86	7,51	7,57
<b>pH Cont. C</b>	7,61	7,33	7,34
<b>pH RCK C</b>	7,67	7,44	7,39



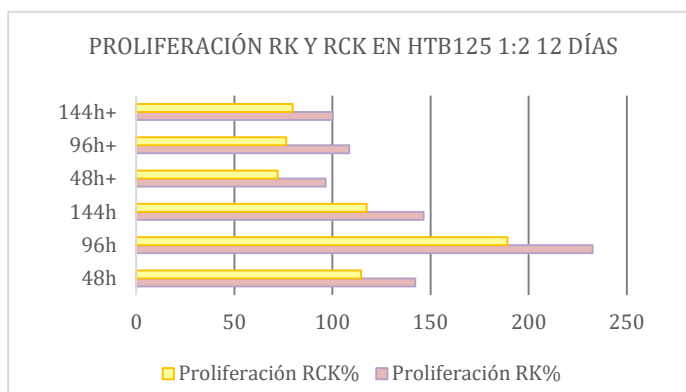
Tiempo	RK Proliferación %		
	t48h	t96h	t144h
pH A	160,6	533,0	588,0
pH B	142,3	232,6	146,5
pH C	109,7	107,3	113,8

Tiempo	RK VALORES DE pH		
	t48h	t96h	t144h
pH Cont. A	6,40	6,26	6,34
pH RK A	7,21	7,06	7,15
pH Cont. B	7,92	7,40	7,42
pH RK B	8,18	7,74	7,72
pH Cont. C	7,61	7,33	7,34
pH RK C	7,93	7,66	7,71

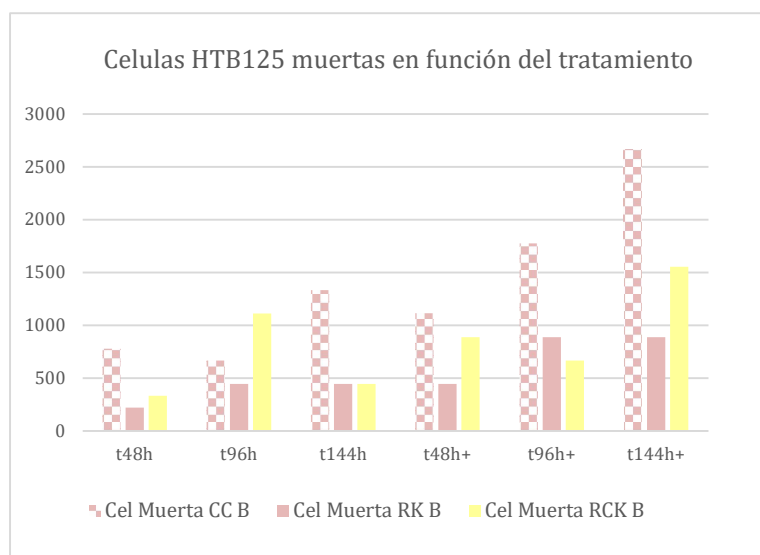
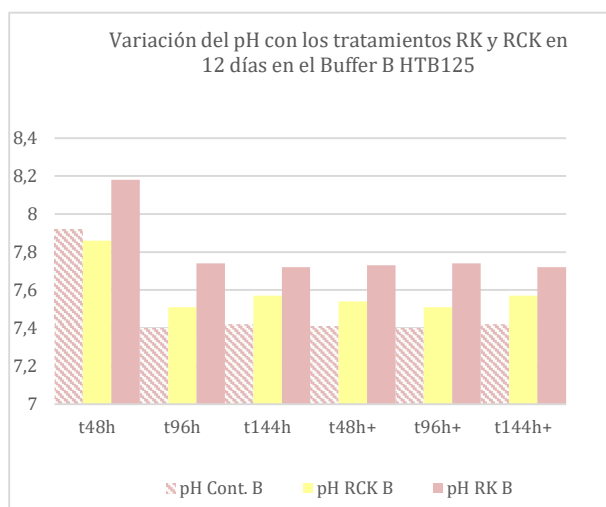
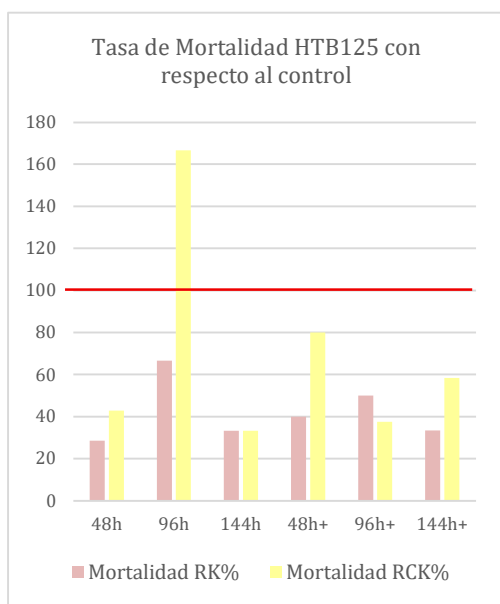


## CELULAS HTB125 SANAS

12 días relación 1:2, 2 moles de potasio		
Tiempo	Proliferación RK%	Proliferación RCK%
48h	142,3	114,6
96h	232,6	189,2
144h	146,5	117,5
48h+	96,6	72,1
96h+	108,6	76,5
144h+	100,2	79,7



VALORES DE pH hasta 12 días						
Tiempo	t48h	t96h	t144h	t48h+	t96h+	t144h+
pH Cont. B	7,92	7,40	7,42	7,41	7,40	7,42
pH RCK B	7,86	7,51	7,57	7,54	7,51	7,57
pH RK B	8,18	7,74	7,72	7,73	7,74	7,72

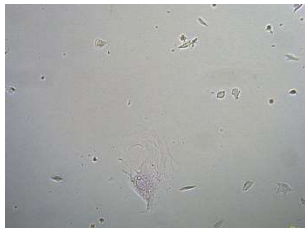


## **Morfología y tinción PAS (glicoproteínas) en este ensayo: HTB125**

t48h de ensayo

Objetivos de 5X y 10X

### **CONTROL A (RK y RCK)**



### **RK A**



### **RCK A**



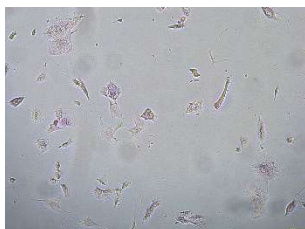
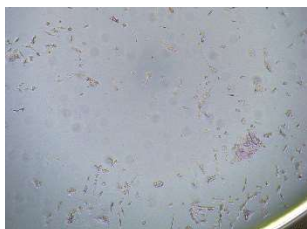
### **CONTROL B (RK y RCK)**



### **RK B**



### **RCK B**



**CONTROL C (RK y RCK)**



**RK C**



**RCK C**

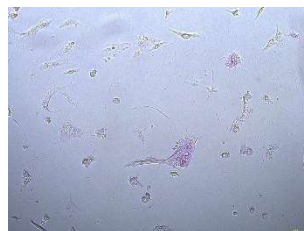
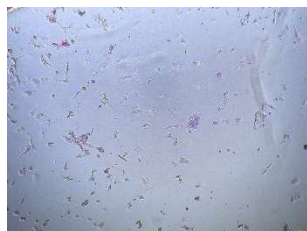


**t96h de ensayo  
Objetivos de 5X y 10X**

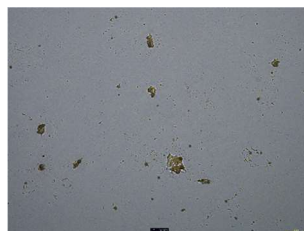
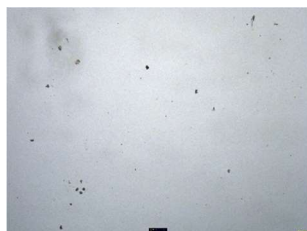
**CONTROL A (RK y RCK)**



**RK A**



**RCK A**



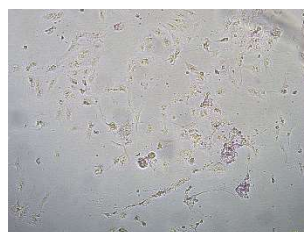
**CONTROL B (RK y RCK)**



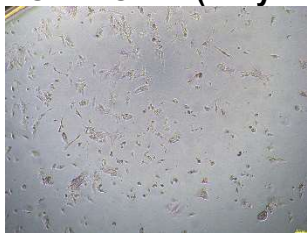
**RK B**



**RCK B**



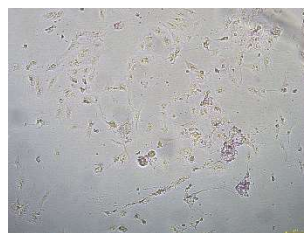
**CONTROL C (RK y RCK)**



**RK C**



**RCK C**

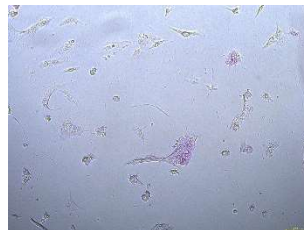


**t144h de ensayo**  
**Objetivos de 5X y 10X**

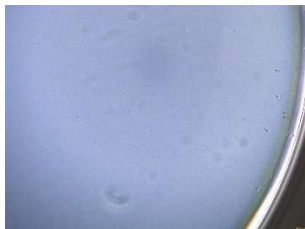
**CONTROL A (RK y RCK)**



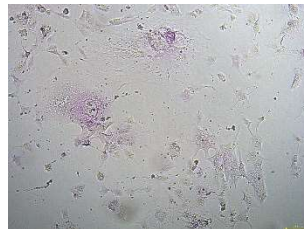
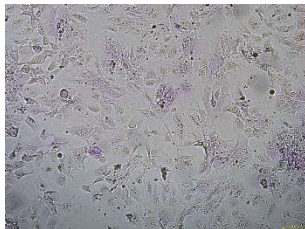
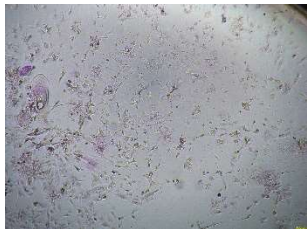
**RK A**



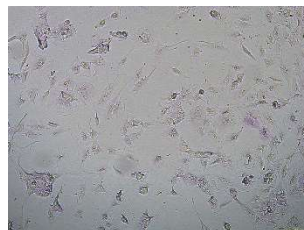
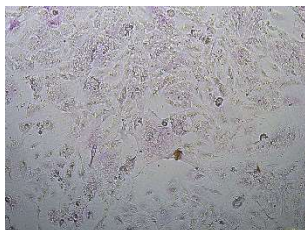
**RCK A**



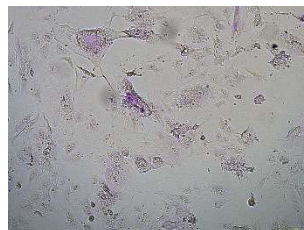
**CONTROL B (RK y RCK)**



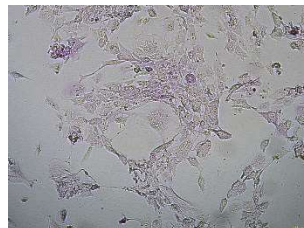
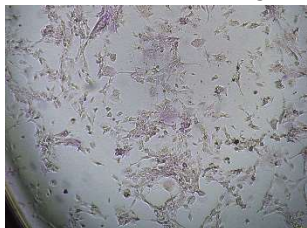
**RK B**



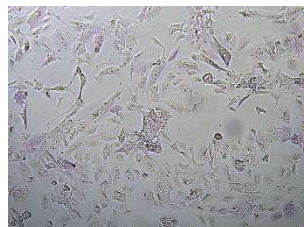
**RCK B**



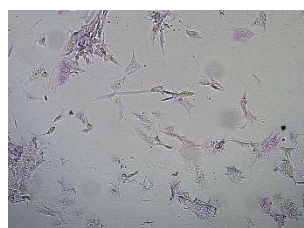
**CONTROL C (RK y RCK)**



**RK C**

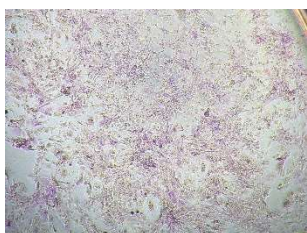


**RCK C**

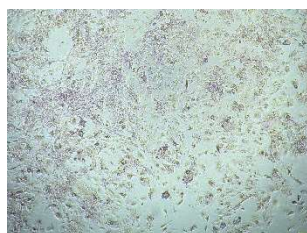


**Buffer B tiempos + (12 DíAS)**

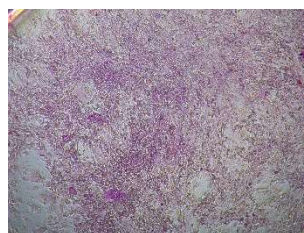
**t48h+**



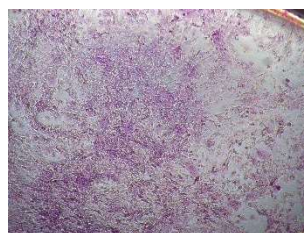
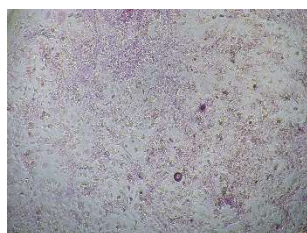
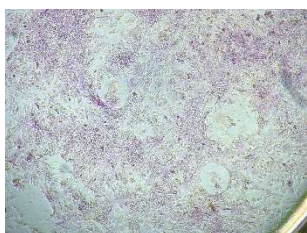
**t96h+**



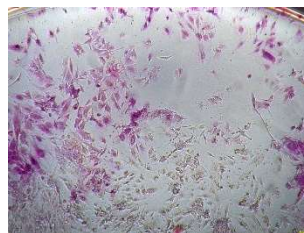
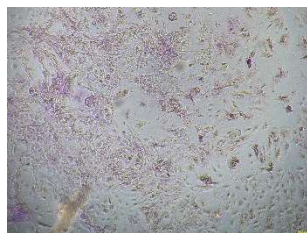
**t144h+**



**CONTROL**



**RK 1:2**



**RCK 1:2**

## **Discusión de Resultados**

### **Tinción PAS en células HTB125 Sanas.**

Cuando evaluamos tinciones es imprescindible determinar el carácter general de la información que ofrece dicha tinción, en este caso debemos tener en cuenta que en todas las células animales están presentes Glicoproteínas acídicas, localizadas fuera de la superficie de la membrana plasmática. Cuando las células reciben un estímulo inmunitario adaptativo producen más Glicoproteínas, esta respuesta puede verse estimulada por una alta dismutación de peróxido de hidrogeno, hecho que puede ser generado por el suministro de suplementos antioxidantes. En consecuencia, aumenta la eficiencia del sistema inmunitario por la activación de los sistemas enzimáticos de defensa, protegiendo así a las células contra el estrés oxidativo.[16,17] La evolución de los cultivos celulares de HTB125 (sanos) evidencia una mayor intensidad en la tinción PAS en las condiciones tratadas en el pH B y C, y el resto de las condiciones permanece en una presencia de Glicoproteínas bastante disminuida. Es importante resaltar que estas condiciones nombradas mantienen un pH fisiológico hacia la alcalinización, en estos valores se estimula la producción de glicoproteínas y se aberturan los canales proteicos para dar entrada con mayor facilidad a los iones potasio suministrados, los cuales se caracterizan por transportarse a través de estos canales proteicos al interior de la célula.

Esta tinción evidencia equilibrio y calidad de la morfología celular para la línea HTB125, sin evidenciar aspectos negativos ni de toxicidad son los pH B y C en las condiciones tratadas, reflejando para el pH C una morfología alargada y de mayor crecimiento incluso en el control.

### **Proliferación y Mortalidad de HTB125 frente a RK y RCK**

Las gráficas de proliferación evidencian un efecto marcadamente positivo de los tratamientos RK y RCK comparados con el control, sin embargo, la influencia del RCK, aunque en un margen muy pequeño muestra valores por debajo del control en proliferación, pero el aspecto de las células en la tinción PAS reflejan una mayor producción de glicoproteínas cuando disminuye la proliferación, implicando que el RCK no puede trabajar en todas las características positivas con igualdad de fuerza, adicionalmente esta disminuido el efecto de buffer ya que no hay presencia del exceso de bicarbonato de potasio. Este factor no influye a gran escala en el tratamiento con RK, ya que esta solución marca un pH más alcalino que el RCK.

Los controles evidencian un comportamiento óptimo bajo la influencia del pH C, condición de mayor alcalinidad en proliferación, menor cantidad de células muertas y más estabilidad en la tinción PAS. Por lo que la alcalinidad es beneficiosa e influye en aspectos positivos del metabolismo de las glicoproteínas y la correcta proliferación celular.

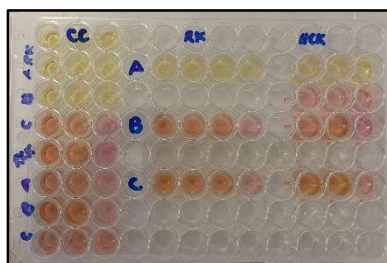
### **Ensayo de 12 días a PH B tratados con RK y RCK**

El ensayo de 12 días evidencia principalmente un buen desarrollo de las células HTB125, sin embargo, el mejor efecto en constancia de proliferación viable y menor número de células muertas corresponde al RK, el cual se ve menos afectado por las variables evaluadas y supera a los resultados obtenidos para todos los controles de en

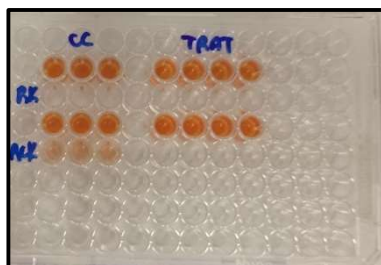
los aspectos antes mencionados. Resaltando que después de una semana se observa mayor crecimiento por célula que aumento en la proliferación, adicional a ello el espacio de expansión se ve reducido lo que genera una disminución de proliferación.

#### 4.1.2

#### Línea celular HTB126 epitelial Triple negativo tumoral



Ensayo 6 días

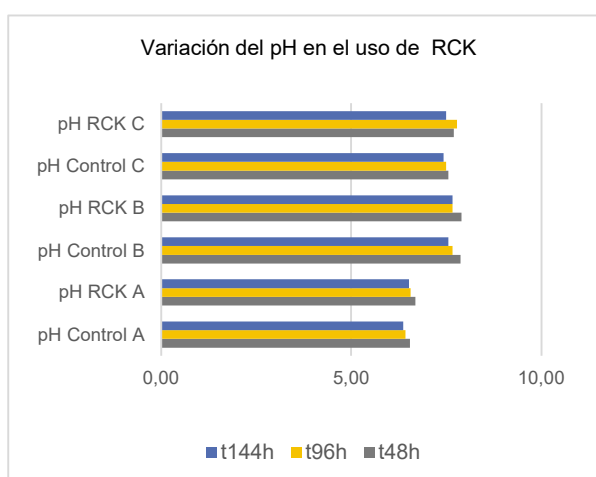
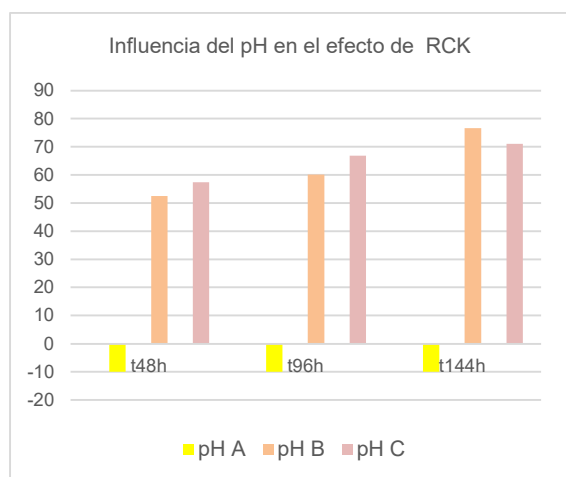


Ensayo hasta 12 días

#### VARIACIÓN DE LA CITOXCICIDAD DE LAS CELULAS HTB126 FRENTE A RK Y RCK EN 3 CONDICIONES DE Ph DIFERENTES

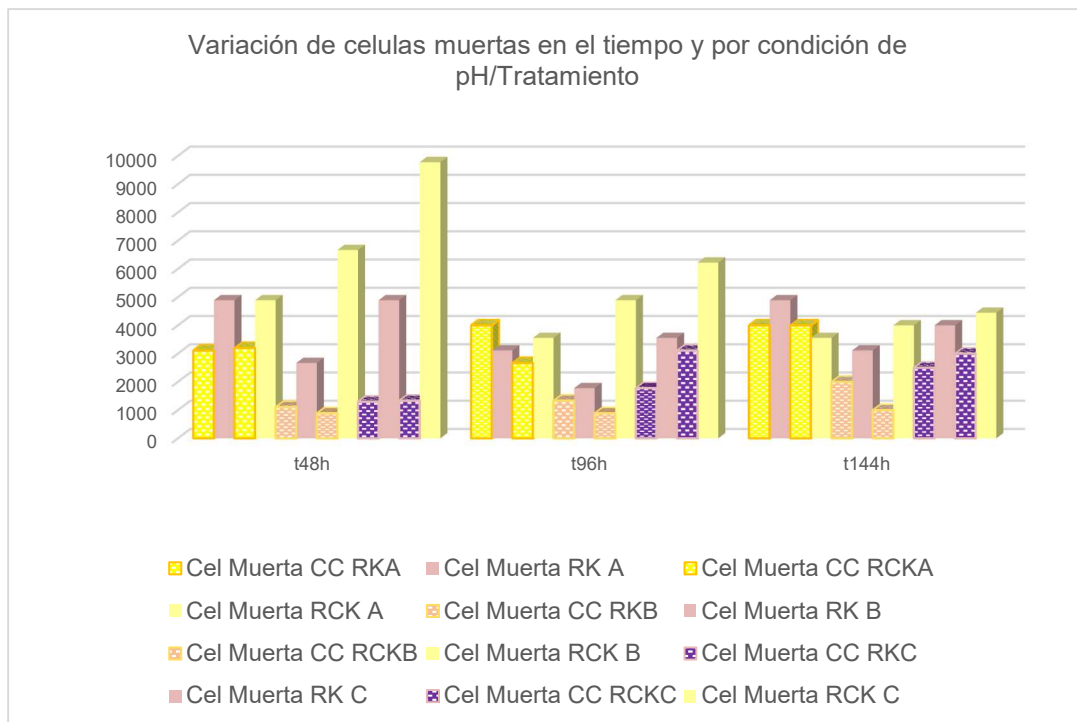
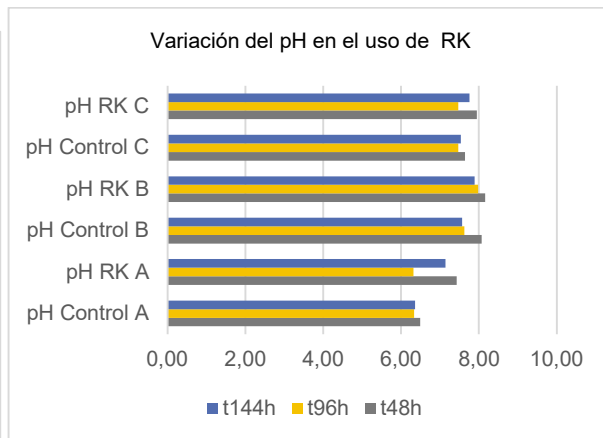
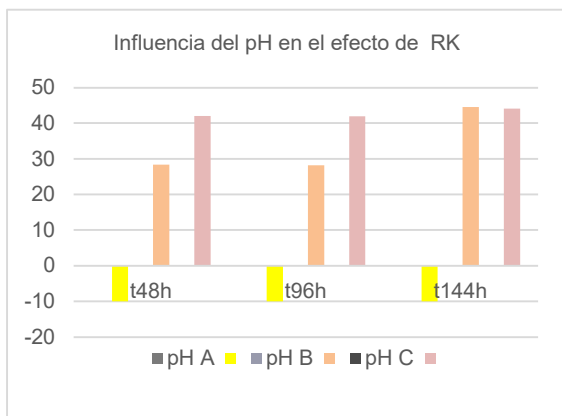
Tiempo	RCK CITOTOXICIDAD %		
	t48h	t96h	t144h
pH A	-1,0	-1,0	-1,0
pH B	52,5	60,1	76,6
pH C	57,4	66,8	71,1

Tiempo	RCK VALORES DE pH		
	t48h	t96h	t144h
pH Control A	6,55	6,43	6,37
pH RCK A	6,69	6,56	6,52
pH Control B	7,88	7,67	7,56
pH RCK B	7,90	7,67	7,67
pH Control C	7,56	7,50	7,43
pH RCK C	7,70	7,78	7,50



RK CITOTOXICIDAD %			
Tiempo	t48h	t96h	t144h
pH A	-1,0	-1,0	-1,0
pH B	28,4	28,2	44,5
pH C	42,0	41,9	44,1

RK VALORES DE pH			
Tiempo	t48h	t96h	t144h
pH Control A	6,49	6,34	6,36
pH RK A	7,43	6,32	7,14
pH Control B	8,07	7,63	7,57
pH RK B	8,16	7,98	7,89
pH Control C	7,64	7,47	7,54
pH RK C	7,95	7,47	7,76



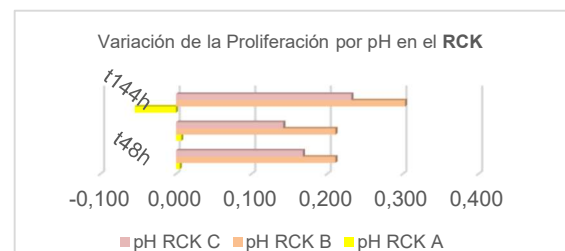
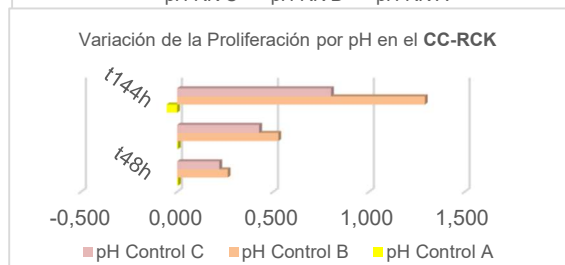
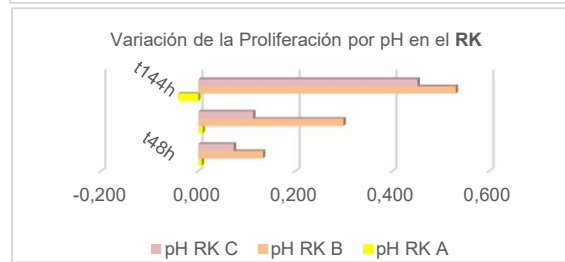
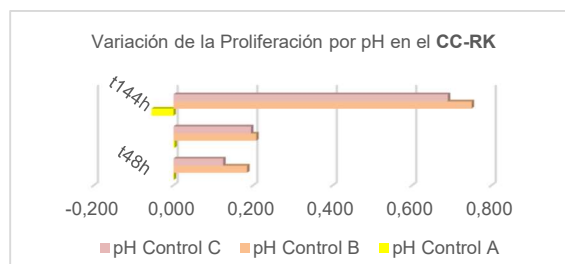
## VARIACIÓN DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR HTB126 FRENTE A RK Y RCK, EN FUNCIÓN DE LA ABSORBANCIA

RK	t48h	t96h	t144h
pH Control A	0,001	0,003	-0,055
pH Control B	0,185	0,208	0,750
pH Control C	0,125	0,195	0,690

RK	t48h	t96h	t144h
pH RK A	0,007	0,009	-0,042
pH RK B	0,133	0,299	0,531
pH RK C	0,073	0,113	0,452

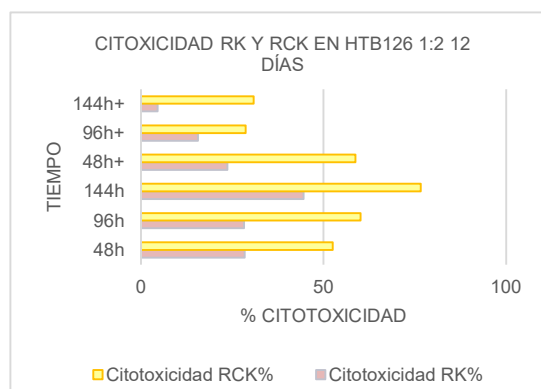
RCK	t48h	t96h	t144h
pH Control A	0,005	0,004	-0,055
pH Control B	0,263	0,527	1,292
pH Control C	0,220	0,427	0,802

RCK	t48h	t96h	t144h
pH RCK A	0,005	0,007	-0,055
pH RCK B	0,211	0,211	0,303
pH RCK C	0,168	0,142	0,232

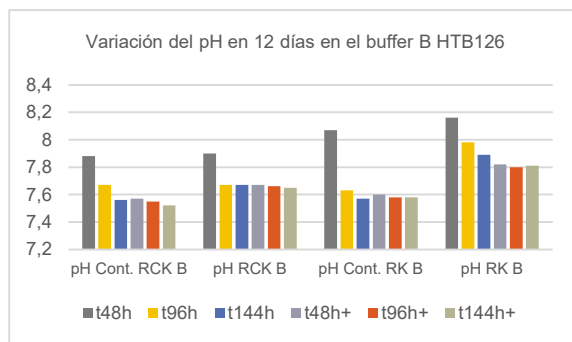


## CELULAS HTB126 TUMORALES

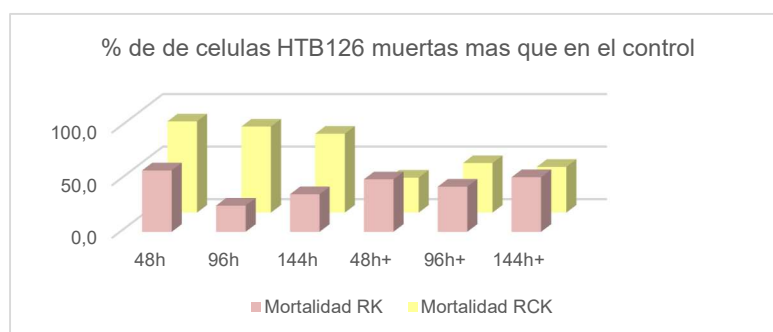
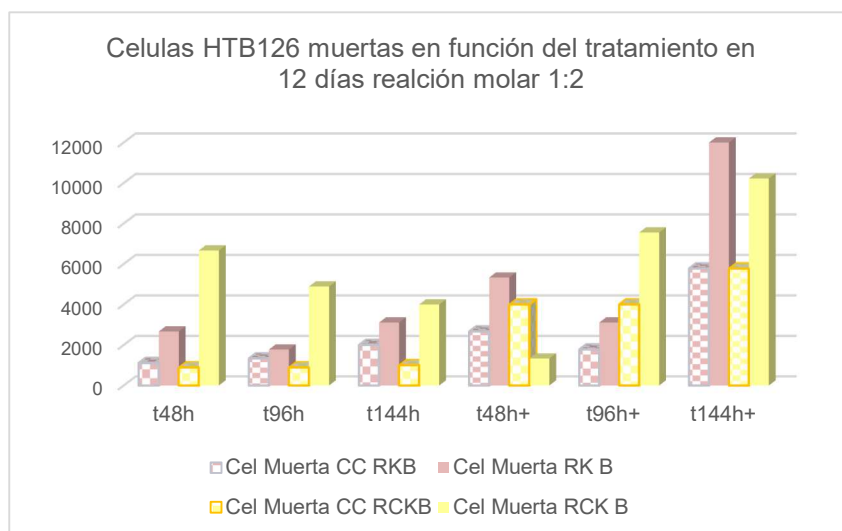
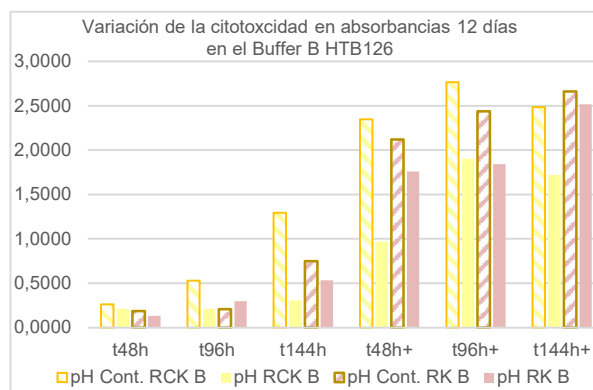
12 días relación 1:2, 2 moles de potasio		
Tiempo	Citotoxicidad RK%	Citotoxicidad RCK%
48h	28,4	52,5
96h	28,2	60,1
144h	44,5	76,6
48h+	23,7	58,7
96h+	15,6	28,7
144h+	4,6	30,9



Tiempo	VALORES DE pH					
	t48h	t96h	t144h	t48h+	t96h+	t144h+
pH Cont. RCK B	7,88	7,67	7,56	7,57	7,55	7,52
pH RCK B	7,9	7,67	7,67	7,67	7,66	7,65
pH Cont. RK B	8,07	7,63	7,57	7,6	7,58	7,58
pH RK B	8,16	7,98	7,89	7,82	7,80	7,81



Tiempo	Valores de Absorbancia					
	t48h	t96h	t144h	t48h+	t96h+	t144h+
pH Cont. RCK B	0,2630	0,5270	1,2920	2,3475	2,7660	2,4835
pH RCK B	0,2110	0,2110	0,3030	0,9695	1,9020	1,7173
pH Cont. RK B	0,1850	0,2080	0,7500	2,1205	2,4370	2,6600
pH RK B	0,1330	0,2990	0,5310	1,7590	1,8407	2,5170



## **Morfología y tinción PAS (glicoproteínas) en este ensayo: HTB126**

**t48h de ensayo**  
**Objetivos de 5X y 10X**

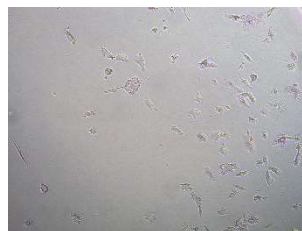
### **CONTROL A RK**



### **RK A**



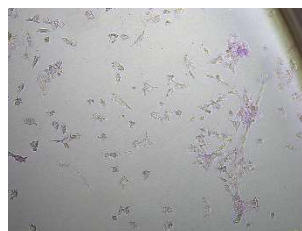
### **CONTROL A RCK**



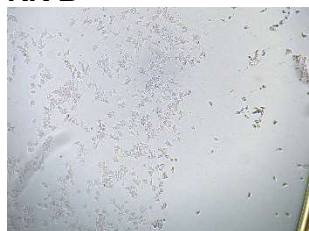
### **RCK A**



### **CONTROL B RK**



### **RK B**



**CONTROL B RCK**



**RCK B**



**CONTROL C RK**



**RK C**



**CONTROL C RCK**



**RCK C**



**t96h de ensayo**  
**Objetivos de 5X y 10X**

**CONTROL A RK**



**RK A**



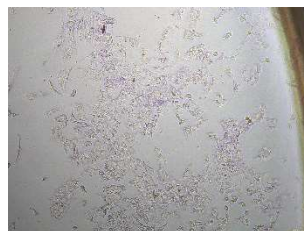
**CONTROL A RCK**



**RCK A**



**CONTROL B RK**



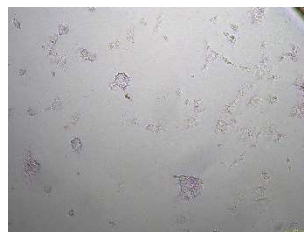
**RK B**



**CONTROL B RCK**



**RCK B**



**CONTROL C RK**



**RK C**



**CONTROL C RCK**

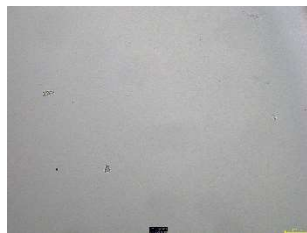


**RCK C**



**T144h de ensayo  
Objetivos de 5X y 10X**

**CONTROL A RK**



**RK A**



**CONTROL A RCK**



**RCK A**



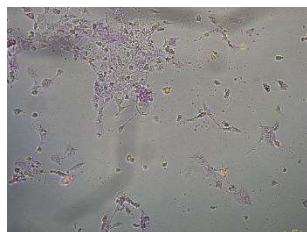
**CONTROL B RK**



**RK B**



**CONTROL B RCK**



**RCK B**



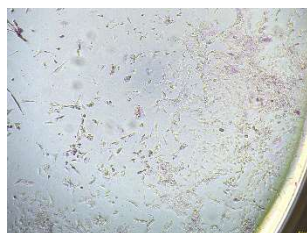
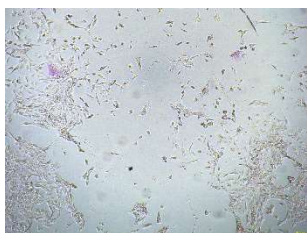
**CONTROL C RK**



**RK C**



**CONTROL C RCK**

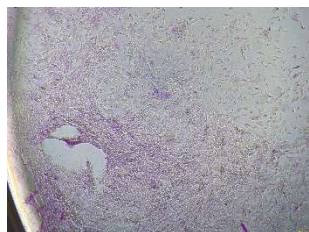


**RCK C**



**Buffer B tiempos + (12 DÍAS)**

**t48h+**



**CONTROL RK**



**RK 1:2**

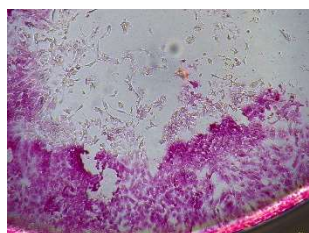


**CONTROL RCK**

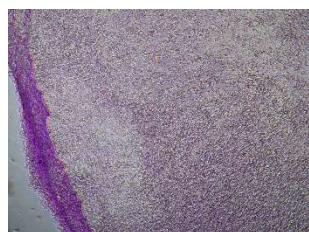
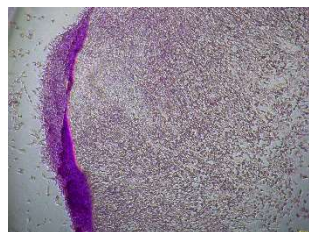


**RCK 1:2**

**t96h+**



**t144h+**



**Discusión de Resultados**

**Tinción PAS en células HTB126 Tumorales.**

Al evaluar los cultivos de la línea celular HTB126 tumoral triple negativo ante los tratamientos: RK y RCK observamos una alta variación de la respuesta glicoproteica de estas células ante estas moléculas. Inicialmente la mayor estimulación de estos metabolitos fue creada por el RK a las 96h+ de haber colocado el tratamiento, en gran parte del cultivo y no de forma homogénea. Siguiendo la evolución del ensayo en el tiempo 144h+ esa coloración de actividad PAS se intensifica y se aprecia que sobre la superficie de los cultivos tratados hay zonas que se tiñen con gran intensidad lo que implica mayor actividad de glicoproteínas,[13] este aumento de actividad puede traducirse en un incremento de los valores de glucógenos y con él muchas mucinas, lo que demuestra que estas células están en situación de defensa y explica que la tinción se intensifica en las zonas de cúmulos o mayor densidad celular (cordón celular). La evolución de los cultivos celulares de HTB126 (tumoral) evidencia una mayor intensidad en la tinción PAS en la condición tratada en el pH C, y el resto de las condiciones

permanecen en una presencia de Glicoproteínas bastante disminuida. Es importante resaltar que esta condición nombrada mantiene un pH fisiológico hacia la alcalinización, en estos valores se estimula la producción de glicoproteínas y se aberturan los canales proteicos para dar entrada con mayor facilidad a los iones potasio suministrados, los cuales se caracterizan por transportarse a través de estos canales proteicos al interior de la célula, este hecho en esta línea celular tumoral conlleva a la activación de sus defensas frente al aumento de la concentración de potasio que rompe con el equilibrio electrolítico de iones sodio-potasio en estas células mermando la energía que necesitan para proliferarse y duplicarse. Esta tinción evidencia ataque y ruptura de los cúmulos de la morfología celular para la línea HTB126, evidenciando toxicidad especialmente en los pH B y C en las condiciones tratadas, reflejando para el pH C un mayor ataque de RK disminuyendo la proliferación marcadamente con respecto a su control, y para el pH B una mayor ataque de RCK (alcanza un pH más alcalino en esta condición). También hay que resaltar que en las condiciones control, éstos se ven más afectados por el pH alcalino de C, con respecto a la proliferación, que el control del pH B de menor alcalinidad.

### **Proliferación y Mortalidad de HTB126 frente a RK y RCK**

Las gráficas de proliferación evidencian un efecto toxico sobre las células tumorales de los tratamientos RK y RCK comparados con sus controles respectivos, sin embargo, la influencia del RCK es mucho mayor mostrando valores por debajo del control en proliferación. La tasa de células muertas siempre es mayor al control y en el pH C en mayor grado para RK que para RCK, lo que deja de manifiesto que es el pH C donde la eficiencia de RK es mayor. Sin embargo, RCK alcanza su mayor efecto en el pH B, ya que atiende a valores de pH más alcalinos a pesar de que el buffer C inicia en mayor valor de pH. Esto implica que el equilibrio electrolito acido base del medio cuando se trata con RCK se ve desplazado hacia la acidez afectando la fuerza de la función del RCK.[18]

Los controles evidencian un comportamiento optimo en proliferación bajo la influencia del pH B, condición de alcalinidad media, menor cantidad de células muertas. Por lo que la alta alcalinidad no es beneficiosa en esta línea de células tumorales e influye en el metabolismo glicoproteico reflejado en la coloración de la tinción PAS y la proliferación celular.

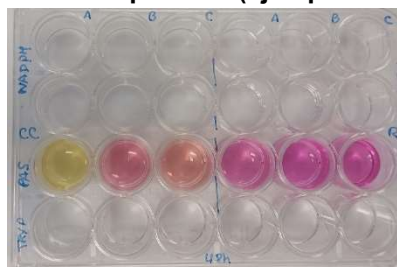
### **Ensayo de 12 días a PH B tratados con RK y RCK**

El ensayo de 12 días evidencia principalmente una falta de espacio para el crecimiento de los controles de las células HTB126, implicando que las medidas de absorbancia, de la técnica utilizada, de los controles seguramente estén por debajo del valor real, ya que no se logra la interacción de todas las capas de células con los reactivos colorimétricos, es decir, que da un valor de menor células viables de las reales. A pesar de este posible error la absorbancia de las condiciones tratadas está por debajo de sus respectivos controles evidenciando el efecto de inducción de apoptosis y la disminución de la velocidad de duplicación en las células tumorales que ejercen RK y RCK. El tratamiento con RCK presenta los valores más grandes de toxicidad disminuyendo la viabilidad del cultivo con respecto al control, sin embargo, el tratamiento con RK mantiene la tasa de células muertas constante e incluso mayor a la de RCK para el tiempo final del ensayo. Este hecho va acompañado a la característica de que el RK mantiene la

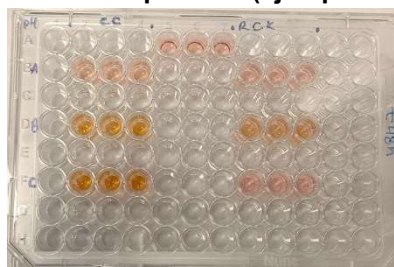
alcalinización del entorno *in vitro* mejor que el RCK, generando que las células tumorales se vean más afectadas por el tratamiento. En la bibliografía se reportan estudios que demuestran que la acidez del medio puede provocar la ruptura química del ácido L-ascórbico y la alta alcalinización genera la pérdida furanósica del mismo, en ambos casos implicaría la pérdida de la funcionalidad del RCK. En el caso del activo D-Ribosa se caracteriza por protonarse en pH ácidos y por desprotonarse a pH alcalinos, esta alcalinización optimiza la función como Ribosato del RK y adicionalmente la velocidad de esta variación es muy baja, lo que le aporta estabilidad al RK con respecto al RCK. Es indiscutible la importancia de mantener el pH del entorno sobre el pH fisiológico normal de las células (sin exceder en alcalinización) para garantizar un mejor efecto citotóxico de los tratamientos con RCK y RK, este último en menor grado.

#### 4.2. Resultados Experimentales. RCK frente al Co-CpH HTB125/126

Sistema 24 pocillos (ejemplo t48h)



Sistema 96 pocillos (ejemplo t48h)



Estos resultados se recogen representados en sus valores de porcentaje en la tabla#2 y el número de células vivas por pocillo junto a su valor correspondiente de estrés oxidativo se recogen en la tabla#1.

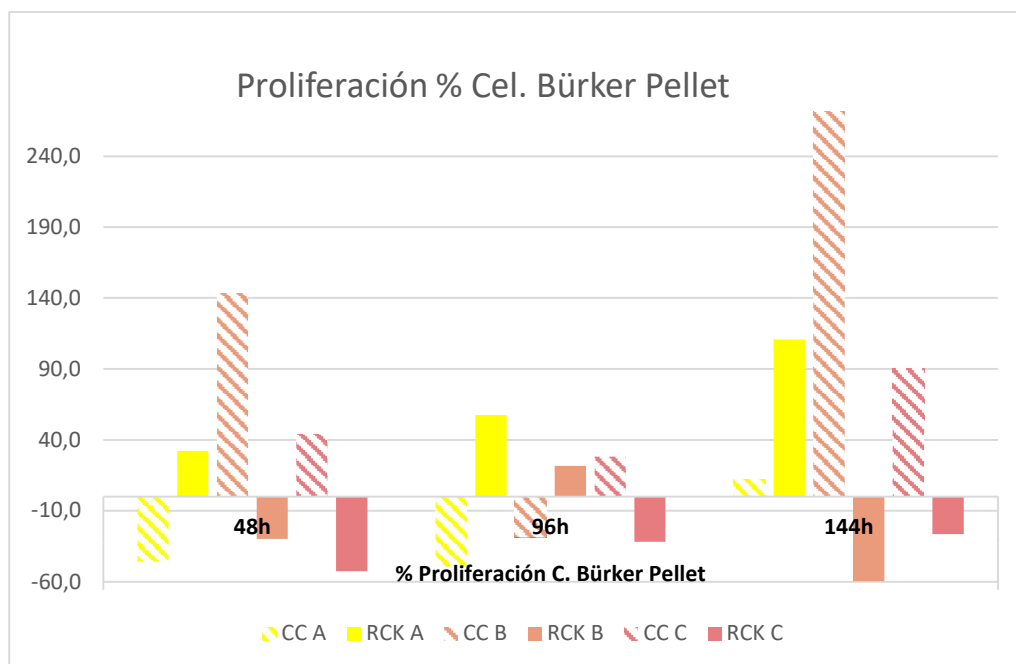
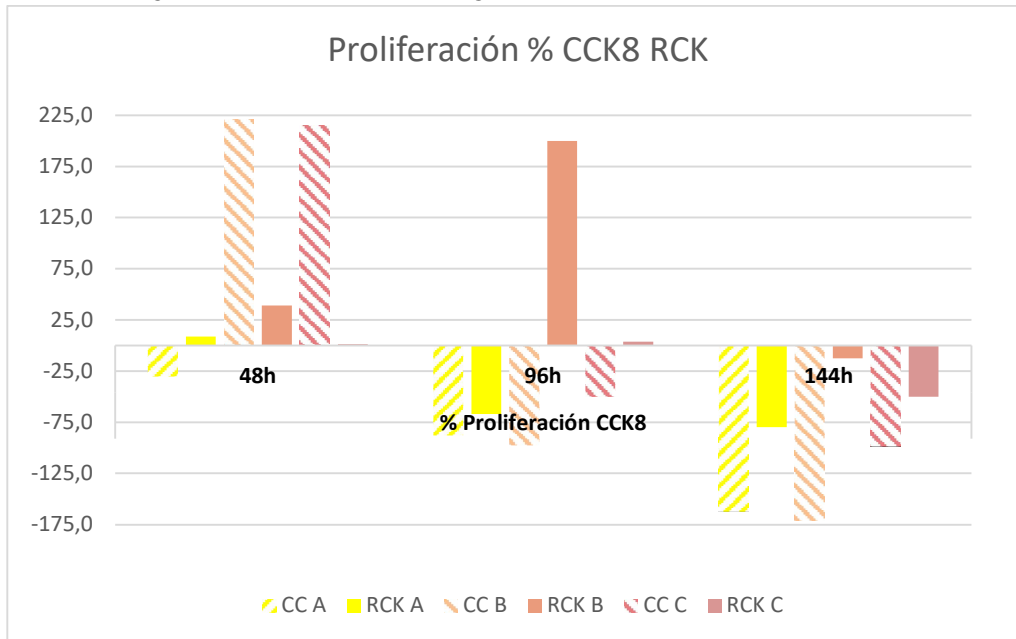
TABLA#1

	células vivas pellet			Test NADPH (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )			% stress Oxdt./cel		
	48h	96h	144h	48h	96h	144h	48h	96h	144h
<b>CC A</b>	6500,0	3300,0	3700,0	0,093	-0,008	0,114	1,43E-05	-2,32E-06	3,09E-05
<b>RCK A</b>	8600,0	5200,0	7800,0	-1,105	-0,910	0,075	-0,000129	-0,000175	9,63E-06
<b>CC B</b>	28500,0	20300,0	75400,0	0,055	0,140	-0,619	1,93E-06	6,92E-06	-8,21E-06
<b>RCK B</b>	20000,0	24700,0	30400,0	-0,847	-1,140	-0,503	-4,23E-05	-4,62E-05	-1,66E-05
<b>CC C</b>	19600,0	25100,0	47700,0	0,074	0,034	0,105	3,77E-06	1,35E-06	2,2E-06
<b>RCK C</b>	9300,0	17100,0	35100,0	0,318	0,081	0,075	3,42E-05	4,76E-06	2,14E-06

TABLA#2

Muestra	% cel vivas total			% cel Muertas total			% cel vivas Sobre.		
	48h	96h	144h	48h	96h	144h	48h	96h	144h
<b>CC A</b>	55,2	63,1	50,6	44,8	36,9	49,4	15,2	12,3	24,7
<b>RCK A</b>	54,6	65,8	43,2	45,4	34,2	56,8	8,6	7,2	17,7
<b>CC B</b>	78,8	100,0	80,2	21,2	0,0	19,8	4,6	3,8	9,6
<b>RCK B</b>	59,8	89,0	67,6	40,2	11,0	32,4	7,9	0,0	2,1
<b>CC C</b>	66,9	84,7	79,1	33,1	15,3	20,9	5,5	4,6	8,1
<b>RCK C</b>	58,0	65,3	64,9	42,0	34,7	35,1	21,0	5,6	7,3

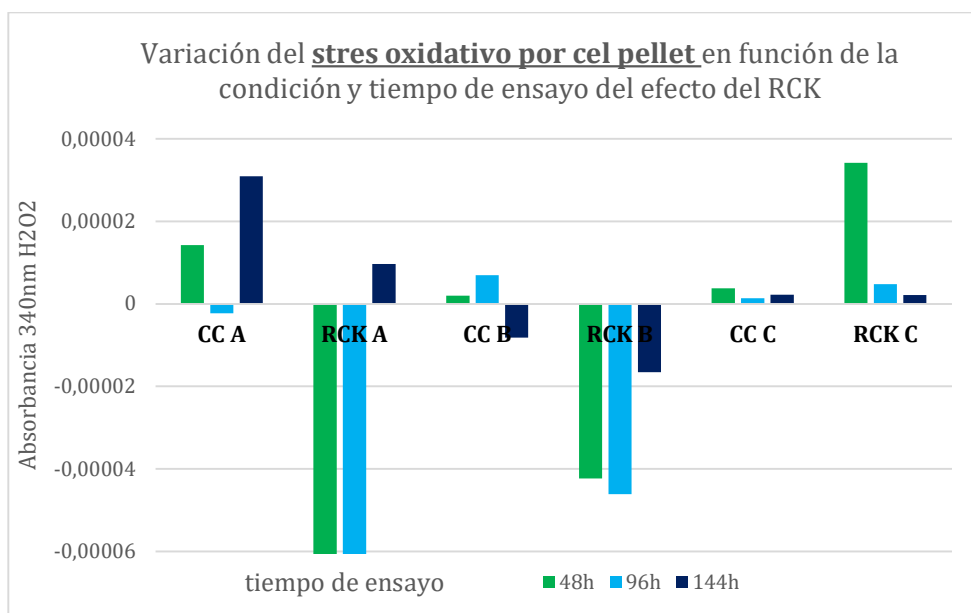
**Variación de la viabilidad celular en las diferentes condiciones del Co-CpH HTB125-126 en porcentajes para cada pH (A, B y C) frente a RCK 42,6mM**



Primero que nada, es imperativo tener en cuenta que la desregulación del pH es característica del cáncer con gradientes de pH anormalmente invertidos entre los valores extracelulares e intracelulares. [19,20] Así, las células cancerosas se caracterizan por la alcalinización intracelular y acidificación extracelular. Como consecuencia, los tumores sólidos están rodeados por un ambiente ligeramente ácido.[21] Los gráficos anteriores reflejan inequívocamente que el pH A es altamente citotóxico para el Co-CpH HTB125-126, ya que el control cada vez esta con menor concentración celular, sin embargo al comparar la proliferación por métodos diferentes nos encontramos que el método de medir la proliferación por el Kit de cell Counteing CCK8 de Sigma Aldrich cuando no se cumplen los parámetros de concentración de la superficie celular, ya sea por defecto o por exceso,

pierde su exactitud, ya que cuando lo comparamos con la medida realizada utilizando el conteo de células en la cámara de Bürker se evidencia que el tiempo 144h los controles pHA, pHB y pHC no son negativos. El control en t144h pHA sufre una adaptación al medio logrando que las células entre en fase positiva de proliferación, los controles t144h pHB y pHC debido a que tienen una alta proliferación se pueden contar con mayor exactitud cuando se tripisinizan las células y se cuentan con la cámara, ya que el kit CCK8 no logra medir toda la superficie celular por exceso de células proliferadas, es decir, este kit cuando hay muy pocas células o exceso de capas celulares no es confiable en la media de proliferación. Otro punto importante por el que este kit CCK8 presenta error es por ejemplo el tiempo t96h B en este se aprecia una proliferación muy alta, producto de resto de RCK cristalizado en el pocillo ya que hay pocas células con las que interaccionar quedando el tratamiento en exceso. Lo que queda reflejado de forma directa es que las condiciones tratadas pHB y pHC proliferan muchísimo menos a partir del t96h con respecto a sus controles y que el pH A tratado prolifera más que su control porque el RCK equilibra el balance del pH ejerciendo de Buffer y generando un mejor ambiente celular en crecimiento. Esta medida de proliferación por conteo en la cámara de Bürker muestra que el pH C va disminuyendo la proliferación en mayor grado que el resto de las condiciones, sin embargo, el pH B en el tiempo t144h muestra un basta ruptura en la proliferación como si actuara más lento por no tener el pH lo suficientemente alcalino como en pHC.

La superficie de estas condiciones si observamos las tinciones PAS y la morfología celular que éstas muestran inferimos que en los pH B y C prevalece las características de una superficie tipo sana comparadas con sus respectivos controles que tienen una proliferación evidentemente tumoral, tomando en cuenta que este Co-CpH HTB125-126 se inició con mayor número de células tumorales que sanas (porque el RCK ataca fuertemente a las células tumorales y si no se siembra una cantidad suficiente no puede ser evaluado el cambio que pueda suceder). La fuerza de ataque del tratamiento activa la presencia de glicoproteínas y también se aprecia con mayor detalle la morfología celular. Unido a esta tinción la evaluación del estrés oxidativo es relevante como se puede apreciar en el siguiente gráfico.



Cuando entrelazamos los resultados del estrés oxidativo (medido mediante el valor de la absorbancia de  $H_2O_2$  producido) con las células del pellet es evidente que en la condición de pH (A) hay mayor presencia de estrés oxidativo, sin embargo en la condición, RCK A, este estrés se agudiza en el tiempo junto a la tasa de mortalidad, dejando claramente expuesto que las células para el t144h tienen una condición adaptativa a ese pH, iniciando una duplicación y por ende valores de estrés en positivo en el Co-CpH HTB125-126, es importante resaltar que en este pH murieron células tanto tumorales como sanas, de hecho lo que se observa en el control es un aumento de la mortalidad y el estrés oxidativo a medida que pasa el tiempo, y la tinción PAS evidencia la pérdida considerable de la superficie celular.

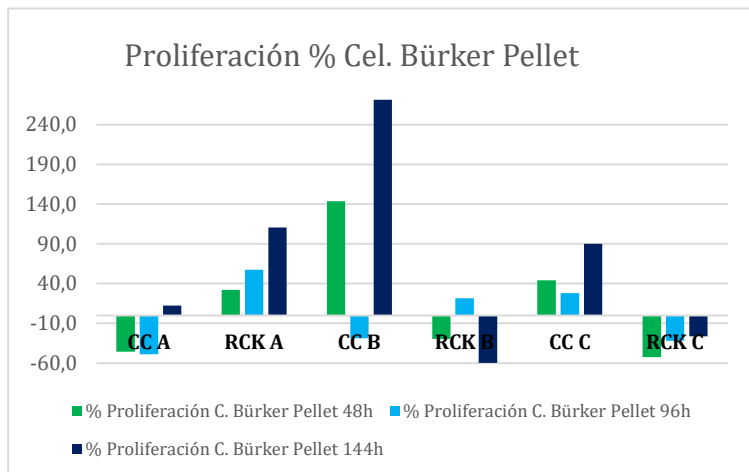
La tinción PAS en el pH A muestra su mayor grado de glicoproteínas para el control (aunque sigue siendo muy poca intensidad) y en la condición tratada se aprecia actividad baja en las zonas con más número de células, ya que se aprecian zonas despobladas y las células que forman grupos son de características alargadas y abiertas con bordes muy suaves, definiendo un perfil de células sanas, indicando que las células que logran la adaptación en el t144h son de morfología sana.

En el caso de la condición de pH RCK B, en el t48h y t96h disminuye la proliferación con respecto a su control y hay un aumento de la muerte celular equilibrando la superficie a mayor número de células sanas con bajo estrés oxidativo, el t144h se hace más estable en este Co-CpH. El estrés oxidativo evaluado es mayor en el control pH B, y hay que recordar que en los controles las células tumorales inducen estrés oxidativo en las células sanas llevándolas a su muerte, por lo que la tasa de mortalidad en los controles está representada por células sanas en mayor escala. En este Co-CpH HTB125-126 hay mayor proporción inicial de células sanas que tumorales por eso en los controles las células muertas son más en el t48-96h que en el t144h y en la condición tratada RCK B estas células muertas van disminuyendo porque prevalece la características de cultivo sano.

La tinción PAS para la condición de pH B es clara, indicando que en los controles el ambiente es cada vez más tumoral, con presencia de conglomerados, pequeños hilos de cordones celulares que se hacen más evidentes en el t144h [5], en las condiciones tratadas con RCK, se pierden estos conglomerados dispersando la superficie celular de forma más homogénea y con mayor tamaño y más alargadas generando un perfil de características de células sanas.

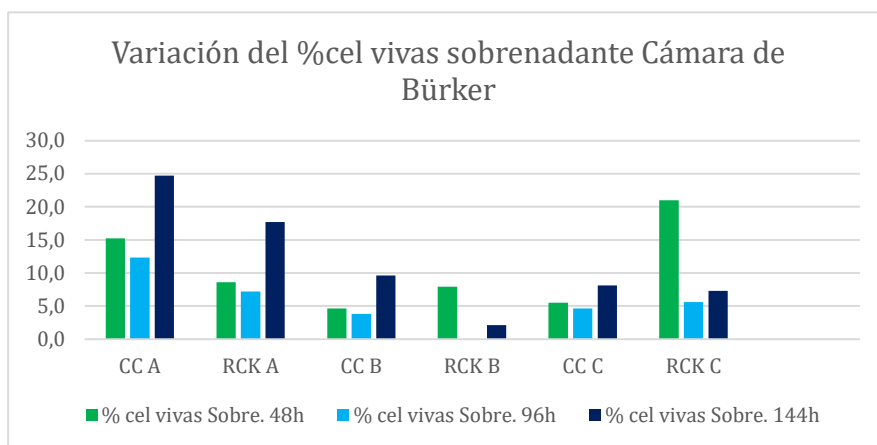
Para el control del pH C observamos que el estrés oxidativo está presente en t48h y luego se hace menor ya que el ataque de las tumorales a las sanas ocurre en mayor grado en las primeras 48 horas de ensayo. También es evidente que la proliferación disminuye en la condición tratada con RCK C desde t48h a t144h, el estrés oxidativo se mantiene presente en los tres tiempos indicando la defensa de las células sanas ante las tumorales en todo el ensayo con un buen número de células muertas. Cuando detallamos la condición de pH C, hay un factor muy importante que reconocer, en la condición control C este pH no beneficia a las células tumorales como lo vimos en el ensayo de estas células individualmente. Las células vivas en ambas condiciones del pH C, control y RCK C, disminúan y las muertas aumentaban, sin embargo, las muertas en mayor porcentaje en la condición tratada. Si tomamos en cuenta que el control también se ve afectado por la alcalinización y que el control va generando muerte de células sanas atacadas por tumorales y por células tumorales que mueren por el pH más alcalino. Lo que nos lleva a decir que en este pH el efecto del tratamiento con RCK es más constante, esta afirmación la respalda la tinción PAS, que muestra una superficie celular con menor actividad glicoproteica señalando menor estado de defensa. También en el t144h el estrés oxidativo empieza a disminuir y a

estabilizarse. En definitiva, la tinción PAS evidencia equilibrio y calidad de la morfología celular para la línea HTB125 de este Co-CpH en el tiempo 144h en la condición RCK C, reflejando para el pH C una morfología de bordes más limpios y de menor número de células muertas, ya que hay menor ataque entre las células existentes sobre la superficie celular.



Al discutir los valores representados en esta grafica de % proliferación con la cámara de Bürker (grafico izquierdo) se evidencia que **la condición tratada con RCK C** ofrece la mejor eficiencia, logrando muerte celular visible para células tumorales como lo explicamos anteriormente y una superficie final celular más homogénea, con menor estrés oxidativo y menos actividad

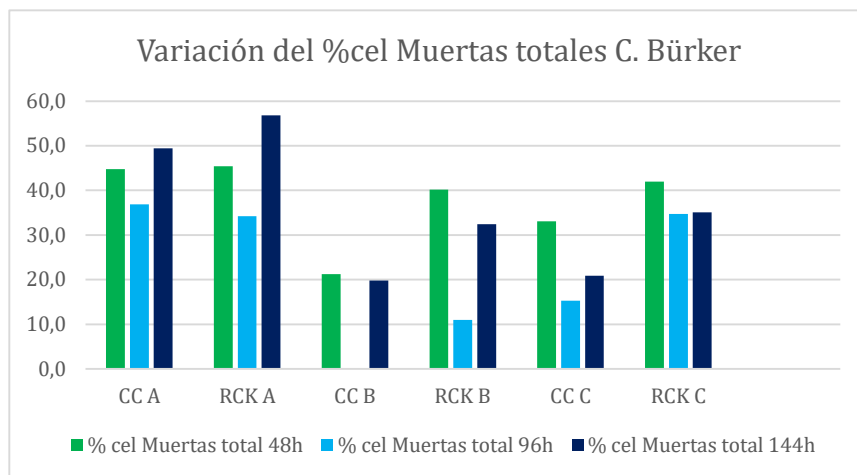
glicoproteica. En el **control de este pH C**, en el t96h el cultivo no prolifera, ya que está activo un ataque de las células tumorales a las células sanas, esta disminución en la proliferación se debe a la muerte de células sanas, y en el tiempo 144h prolifera activamente en clara expresión de una superficie de células tumorales.



Esta característica es muy importante, porque la cantidad de células vivas en el sobrenadante son células que pueden migrar, pero también implica que hay debilidad de adherencia de estas células a la superficie celular,

pero estas células no han muerto solo se han despegado están latentes. Al comparar los controles observamos un factor relevante en pH A y es que no hay adherencia prevalente porque el pH ácido debilita mucho, en pH B el control pierde adherencia en el tiempo 144h cuando la muerte de las células sanas prácticamente es total, el cultivo prolifera con fuerza y adicionalmente hay mayor número de células vivas en suspensión activas para migrar a realizar otros ataques. Finalmente, el control pH C siempre lleva células vivas en suspensión, ya que en cada tiempo en este pH se genera muerte celular y en consecuencia células en suspensión debilitadas.

Cuando evaluamos el % de células muertas el pH A tanto su control como las células tratadas sufren apoptosis en alto grado dada la alta acidez del medio que impide un funcionamiento metabólico y proliferante adecuado. En el pH B y C en el tiempo 48h es donde presentan mayor



apoptosis (ataque de células sanas) en el tiempo 96h la menor cantidad de células muertas y en t144h lo poco que lograra proliferar de células sanas nuevamente es atacado por las células tumorales generando un aumento de la cantidad de células muertas con respecto a su tiempo anterior. En los pH B y C de las condiciones tratadas con RCK tienen mayor número de células muertas en el t48h, en pHB el t96h demuestra lucha para liderar el cultivo entre las dos líneas celulares y en pHC en este mismo tiempo sigue la influencia del RCK atacando a las células tumorales. Para el t144h RCK B y RCK C logran una apoptosis alta en el Co-CpH HTB125-126, siendo más efectiva para la condición C.

Por consiguiente, hemos demostrado que la alta selectividad del RCK para llevar a apoptosis a las células tumorales y a proteger a las células sanas en nuestros Co-CpH HTB125-126 indican un gran avance como alternativa para combatir el cáncer. También se hace evidente que se puede generar un buen ataque aprovechando el microambiente ácido presente. Sin embargo, el estrecho rango de pH para la toxicidad necesaria requiere un ajuste muy delicado de las propiedades fisicoquímicas del entorno para así garantizar el mejor y mayor efecto antitumoral posible.

**Morfología y tinción PAS (glicoproteínas) en este ensayo: Co-CpH HTB125-126**

**t48h de ensayo**

**Objetivos de 5X y 10X**

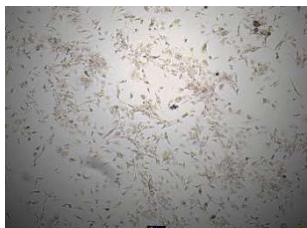
**CONTROL A RCK**



**RCK A**



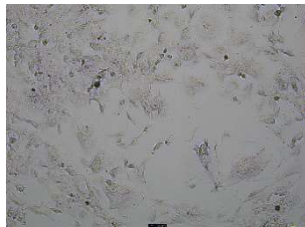
**CONTROL B RCK**



**RCK B**



**CONTROL C RCK**



**RCK C**



**t96h de ensayo**  
**Objetivos de 5X y 10X**

**CONTROL A RCK**



**RCK A**



**CONTROL B RCK**



**RCK B**



**CONTROL C RCK**

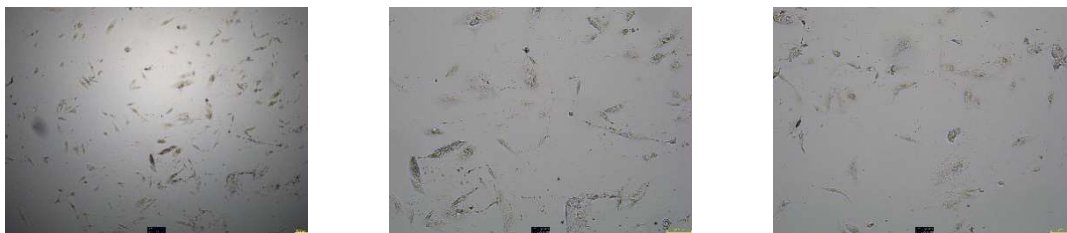


**RCK C**



**t144h de ensayo**  
**Objetivos de 5X y 10X**

**CONTROL A RCK**



**RCK A**



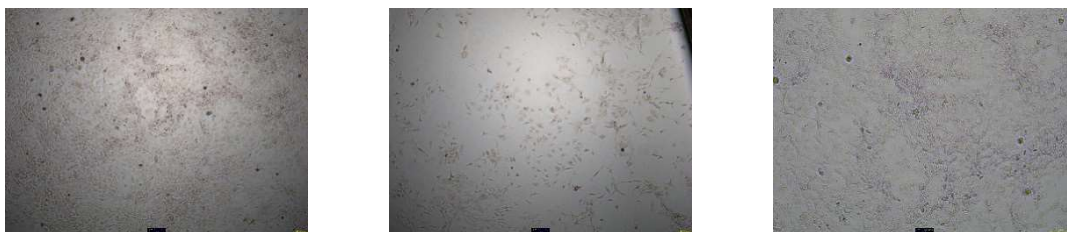
**CONTROL B RCK**



**RCK B**



**CONTROL C RCK**



**RCK C**

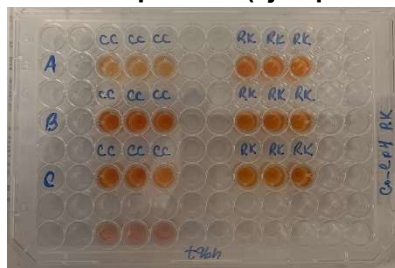


### 4.3 Resultados Experimentales. RK frente al Co-CpH HTB125/126

#### RESULTADOS: Co-Cultivo pH HTB125-126 (85%/15%)

Sistema 24 pocillos (ejemplo t96h)

Sistema 96 pocillos (ejemplo t96h)



Los resultados se recogen en sus valores de porcentaje en la tabla#2 y el número de células vivas por pocillo en la tabla#1.

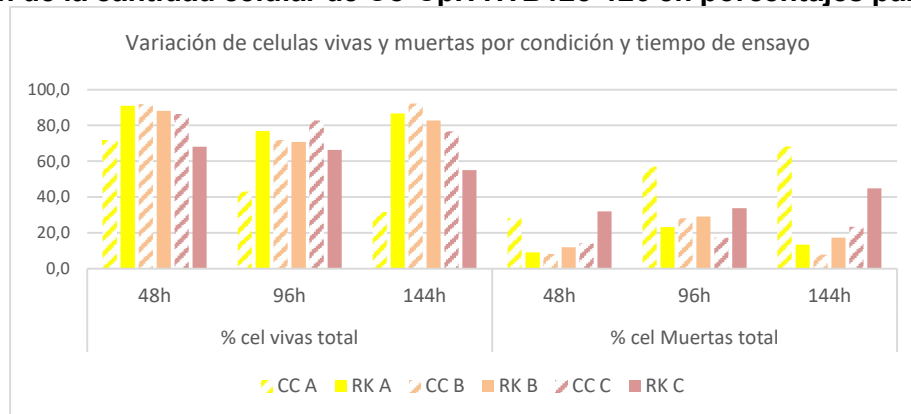
**TABLA#1**

Muestra	células vivas pellet			Test NADPH (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )			% stress Oxdt./cel		
	48h	96h	144h	48h	96h	144h	48h	96h	144h
CC A	14400,0	6080,0	960,0	0,036	0,028	0,029	2,46E-06	4,65E-06	3,05E-05
RK A	13120,0	20960,0	43040,0	0,041	0,048	0,086	3,12E-06	2,27E-06	1,99E-06
CC B	24480,0	23840,0	40480,0	0,046	0,042	0,107	1,89E-06	1,74E-06	2,63E-06
RK B	18880,0	23360,0	33120,0	0,035	0,026	0,045	1,83E-06	1,13E-06	1,37E-06
CC C	15360,0	36480,0	26720,0	0,038	0,036	0,061	2,48E-06	1E-06	2,27E-06
RK C	11040,0	15360,0	8000,0	0,038	0,027	0,017	3,45E-06	1,76E-06	2,13E-06

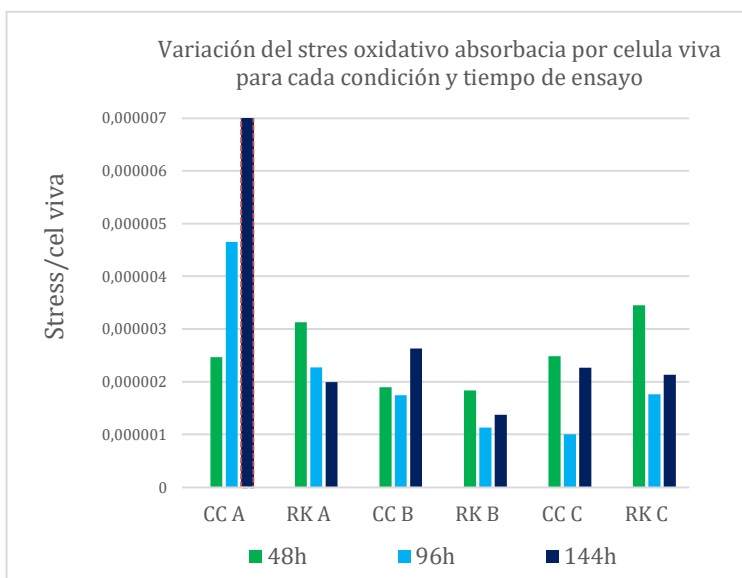
**TABLA#2**

Muestra	% cel vivas total			% cel Muertas total			% cel vivas Sobre.		
	48h	96h	144h	48h	96h	144h	48h	96h	144h
CC A	71,7	43,0	31,7	28,3	57,0	68,3	9,4	2,2	12,7
RK A	90,9	76,8	86,6	9,1	23,2	13,4	6,1	3,9	4,0
CC B	91,8	71,9	92,1	8,2	28,1	7,9	2,0	2,1	2,8
RK B	88,1	70,8	82,7	11,9	29,2	17,3	2,5	6,8	1,4
CC C	85,9	82,7	76,6	14,1	17,3	23,4	4,2	1,4	2,9
RK C	68,1	66,2	55,1	31,9	33,8	44,9	0,7	8,7	4,5

#### Variación de la cantidad celular de Co-CpH HTB125-126 en porcentajes para cada pH



En el grafico anterior se aprecia claramente que en la condición a pH A, condición más acídica, las células se ven beneficiadas por el tratamiento con RK, el aspecto más resaltante es que el pH es regulado a un pH más alcalino por el RK, donde ambos tipos de células, sanas y tumorales, mejoran en proliferación. En esta condición RK A en el tiempo 96h se observa un descenso en las células vivas pero un aumento en células muertas, en este punto hay una interacción de poderes entre células sanas y tumorales en su lucha por prevalecer en el cultivo. Esta situación se equilibra en el tiempo 144h donde la tasa de mortalidad disminuye y la tasa de células vivas va en aumento. La tinción PAS nos indica que la tendencia es a células sanas, por morfología, en la mayor parte del cultivo con



tendencia a mayor producción de glicoproteínas como defensa todavía a una situación de ataque.

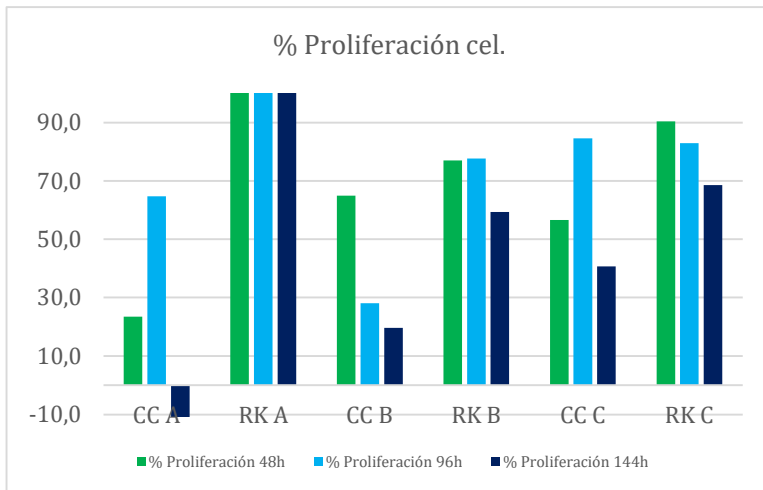
Cuando entrelazamos estos resultados con el estrés oxidativo medido mediante el valor de la absorbancia de  $H_2O_2$  producido es evidente que en esta condición de pH (A) hay mayor presencia de estrés oxidativo, sin embargo en la condición, RK A, este estrés va disminuyendo en el tiempo junto a la tasa de mortalidad antes explicada, dejando

claramente expuesto que las células sanas están en mayoría en el Co-CpH HTB125-126, es importante resaltar que en este pH murieron células tanto tumorales como sanas, de hecho lo que se observa en el control es un aumento de la mortalidad y el estrés oxidativo a medida que pasa el tiempo, y la tinción PAS evidencia la perdida casi al completo de la superficie celular.

En el caso de la condición de pH RK B, en el t96h las células vivas y muertas se van equilibrando, pero ya en el tiempo 144h las células muertas aumentan en la condición tratada. El estrés oxidativo evaluado es mayor en el control, hay que recordar que en los controles las células tumorales inducen estrés oxidativo en las células sanas llevándolas a su muerte, por lo que la tasa de mortalidad en los controles está representada por células sanas en mayor escala. En este Co-CpH HTB125-126 hay mayor proporción inicial de células sanas que tumorales por eso en los controles las células muertas son más en el t96h que en el t144h y en la condición tratada RK B estas células muertas van disminuyendo porque prevalece la características de cultivo sano. La tinción PAS en este pH muestra su mayor grado de glicoproteínas para el control y en la condición tratada se aprecia actividad en las zonas con más número de células, ya que se aprecian zonas despobladas y las células que forman grupos son de características alargadas y abiertas con bordes muy suaves, definiendo perfil de células sanas [5].

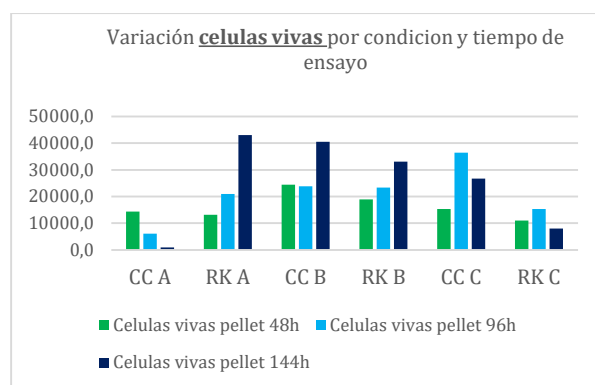
Cuando detallamos la condición de pH C, hay un factor muy importante que reconocer, en la condición control C este pH no beneficia a las células tumorales como lo vimos en el ensayo de estas células individualmente. Las células vivas en ambas condiciones del pH C, control y RK C, disminuían y las muertas aumentaban, sin embargo, las muertas en mayor porcentaje en la condición tratada. Si tomamos en cuenta que el

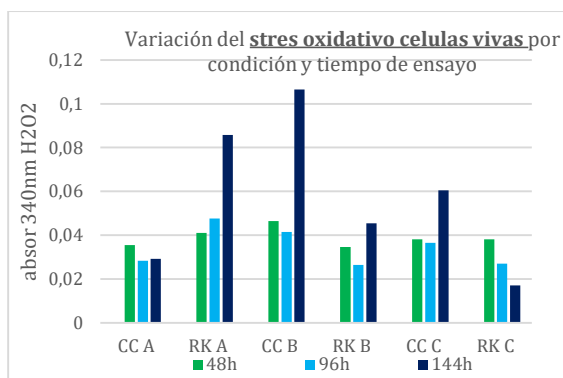
control también se ve afectado por la alcalinización y que el control va generando muerte de células sanas atacadas por tumorales y por células tumorales que mueren por el pH más alcalino.[22] Lo que nos lleva a decir que en este pH el efecto del tratamiento con RK se hace más eficiente, esta afirmación la respalda la tinción PAS, que muestra una superficie celular con menor actividad glicoproteica señalando menor estado de defensa. También en el t144h el estrés oxidativo empieza a disminuir y a estabilizarse. En definitiva, la tinción PAS evidencia equilibrio y calidad de la morfología celular para la línea HTB125 de este Co-CpH en el tiempo 144h en la condición RK C, sin presentar aspectos negativos, reflejando para el pH C una morfología alargada y de mayor crecimiento.



Al discutir los valores representados en esta grafica de % de proliferación de las distintas condiciones se evidencia que la condición tratada con RK C ofrece la mejor eficiencia, logrando muerte celular evidenciada para células tumorales como lo explicamos anteriormente y una superficie final celular más homogénea, con menor estrés oxidativo y menos

actividad glicoproteica. En el control de este pH C, en el t96h el cultivo prolifera para poder duplicar la cantidad de células tumorales suficientes para atacar a las células sanas en el tiempo 144h donde el cultivo también se ve disminuido. Esta disminución se debe a muerte de células sanas y perdida de células tumorales por la alcalinidad del medio con actividad proteica positiva.





Si es evidente que la proliferación disminuye en la condición RK C desde t48h a t144h, pero si detallamos la gráfica de variación de células vivas del t48h con respecto a el t144h, el ataque a las células tumorales ocurre después de t96h generando una disminución de estas células y dejando valores de estrés oxidativo más bajos.

En nuestros resultados hemos demostrado que el RK es selectivo entre células tumorales y sanas, a las primeras las debilita generando apoptosis y a las segundas las protege y las fortalece, evidenciado en nuestros Co-CpH HTB125-126 colocando al RK como una muy buena alternativa para combatir el cáncer. También se hace evidente como en el ensayo con RCK que se puede generar un buen ataque antitumoral aprovechando el microambiente ácido presente. Recordando que es indispensable ajustar pH del entorno para así garantizar el mejor y mayor efecto antitumoral posible.

**Morfología y tinción PAS (glicoproteínas) en este ensayo: Co-CpH HTB125-126**

**t48h de ensayo**

**Objetivos de 5X y 10X**

**CONTROL A RK**



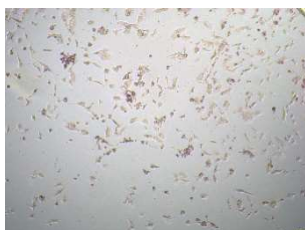
**RK A**



**CONTROL B RK**



**RK B**



**CONTROL C RK**



**RK C**



**t96h de ensayo**  
**Objetivos de 5X y 10X**

**CONTROL A RK**



**RK A**



**CONTROL B RK**



**RK B**



**CONTROL C RK**



**RK C**

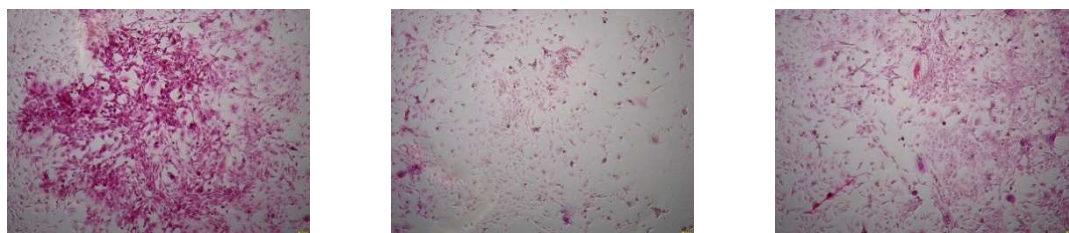


**t144h de ensayo**  
**Objetivos de 5X y 10X**

**CONTROL A RK**



**RK A**



**CONTROL B RK**



**RK B**



**CONTROL C RK**



**RK C**



#### 4 CONCLUSIONES

- ✓ La relación molar 1:2 de la vitamina C o la Ribosa frente al Bicarbonato de Potasio en ensayos *in vitro* en las células HTB125 evidencia:
  - Efecto protector de RK en todas las características evaluadas.
  - Efecto protector se ve disminuido a pH A por no tener la fuerza buffer necesaria para mantener el pH fisiológico alcalinizado.
  
- ✓ La relación molar 1:2 de la vitamina C o la Ribosa frente al Bicarbonato de Potasio en ensayos *in vitro* en las células HTB126 evidencia:
  - Efecto de citotoxicidad de RK en las características de pH B y C evaluadas. En el pH A beneficia la proliferación porque optimiza el pH con respecto al control.
  - El pH con mejor resultado en citotoxicidad, generación de células muertas y disminución de la proliferación para las células HTB126 es pH C para el tratamiento con RK y pH B para el RCK. Es indiscutible la importancia de mantener el pH fisiológico normal alcalinizado al tratar la línea celular HTB126 para garantizar un mejor efecto citotóxico antitumoral de los tratamientos con RCK y RK.
  
- ✓ El pH con mejor resultado en citotoxicidad en el ensayo *in vitro* de Co-CpH HTB125-126 tratado con RCK 42,6mM, en cuanto a generación de células muertas y disminución de la proliferación para las células tipo HTB126, es el pH C. El pH A evidencia alta toxicidad en las dos líneas celulares, HTB125 y HTB126, con alto índice de apoptosis en el control y una adaptabilidad al medio ácido en el t144h con mayor presencia de células sanas en este tiempo para la condición tratada y en el pH B en la condición tratada es donde mejor se controla el número de células vivas en suspensión del sobrenadante en todos los tiempos.
  
- ✓ El pH con mejor resultado en citotoxicidad en el ensayo *in vitro* de Co-CpH HTB125-126 tratado con RK 125mM, en cuanto a generación de células muertas y disminución de la proliferación para las células tipo HTB126 es pH C. El pH A evidencia alta toxicidad en las dos líneas celulares, HTB125 y HTB126, evidenciando alto índice de apoptosis en el control. Es indiscutible la importancia de mantener el pH alcalinizado para combatir a la línea celular HTB126 triple negativo, para así poder garantizar un mejor efecto citotóxico antitumoral del tratamiento con RK125mM.

## **Declaración de contribución de los autores**

*María Gabriela Sánchez-Vega*

Conceptualización. Conservación de datos. Análisis formal. Investigación. Metodología. Administración del proyecto. Software. Supervisión. Validación. Visualización. Redacción - borrador original. Redacción - revisión y edición.

*Guido Paoli*

Recursos. Revisión y edición del trabajo publicado por el grupo de investigación original, comentario o revisión.

*Covadonga González Lazcano*

Obtención de fondos. Administración del proyecto. Revisión y edición.

## **Declaración de conflicto de intereses**

Los autores declaran que no tienen ningún interés financiero en competencia conocido ni relaciones personales que pudieran haber parecido influir en el trabajo presentado en este artículo.

## **Declaración de disponibilidad de los datos de investigación**

- El conjunto de datos que apoya los resultados de este estudio se publicó en el propio artículo.

## **Bibliografía**

1. He, J., Xiong, L., Li, Q., Lin, L., Miao, X., Yan, S., ... Deng, X. (2017). 3D modeling of cancer stem cell niche. *Oncotarget*, 9(1), 1326–1345. doi:10.18632/oncotarget.19847.
2. Prager, B. C., Xie, Q., Bao, S., & Rich, J. N. (2019). Cancer Stem Cells: The Architects of the Tumor Ecosystem Prager. *Cell Stem Cell*, 24(1), 41-53. doi: 10.1016/j.stem.2018.12.009.
3. Bonnans, C., Chou, J., & Werb, Z. (2014). Remodelling the extracellular matrix in development and disease. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 15(12), 786–801. doi:10.1038/nrm3904.
4. Conklin KA. Cancer chemotherapy and antioxidants. *J Nutr.* (2004) Nov;134(11):3201S-3204S. doi: 10.1093/jn/134.11.3201S. PMID: 15514307.
5. Sánchez-Vega, M. G., Guido, P., & González Lazcano, C. (2024). Implementación y evaluación preliminar del Microambiente Tumoral del Co-Cultivo HTB-125 / HTB-126 en respuesta a los tratamientos con Ascorbato de Potasio con Ribosa o Ribosato de Potasio . In SciELO Preprints. <https://doi.org/10.1590/SciELOPreprints.10250>
6. Valsé Pantellini G (1970): Breve cenno sulla genesi dei tumori e sopra una eventuale terapia dei medesimi con sali di potassio e in particolare con ascorbato di potassio. *Rivista di Patologia e Clinica*, XXV: 219-225.
7. Valsé Pantellini G (1974): Legami idrogeno (H) e salificazione degli stessi da parte del potassio (K) nella strutturazione della materia vivente. *Rivista di Patologia e Clinica*, XXIX: 193-198.

8. Valsé Pantellini G (1984): *I nuovi orientamenti sulla terapia dei tumori dal punto di vista biochimico e immunologico*. In Atti del Quarto Convegno Nazionale "L'Uomo tra Microcosmo e Macrocosmo". A cura di Marinucci G. Urbino: 171-176.
9. Valsé Pantellini G, Paoli G (1999): *Meccanismo d'azione dell'ascorbato di potassio nei sistemi biologici*. In LXXXV Congresso Nazionale della Società Italiana di Fisica, Pavia: 108.
10. a) Croci S, Bruni L, Bussolanti S, Castaldo M, Dondi M (2011): *Potassium bicarbonato and D-ribose effects on A72 canine and HTB-126 human cancer cell line proliferation in vitro*. *Cancer Cell Int*, 11:30.  
 b) Cavicchio, C., Benedusi, M., Pambianchi, E., Pecorelli, A., Cervellati, F., Savelli, V., Calamandrei, D., Maellaro, E., Rispoli, G., Maioli, E., & Valacchi, G. (2017). Potassium Ascorbate with Ribose: Promising Therapeutic Approach for Melanoma Treatment. *Oxidative Medicine And Cellular Longevity*, 2017, 1-12. <https://doi.org/10.1155/2017/4256519>  
 c) Anichini, C., Lo Rizzo, C., Longini, M., Paoli, G., Di Bartolo, R. M., Proietti, F., & Buonocore, G. (2011). Beckwith-Wiedemann syndrome: potassium ascorbate with ribose therapy in a syndrome with high neoplastic risk. *PubMed*, 31(11), 3973-3976. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22110229>  
 d) Frajese, G. V., Benvenuto, M., Fantini, M., Ambrosin, E., Sacchetti, P., Masuelli, L., Giganti, M. G., Modesti, A., & Bei, R. (2016). Potassium increases the antitumor effects of ascorbic acid in breast cancer cell lines in vitro. *Oncology Letters*, 11(6), 4224-4234. <https://doi.org/10.3892/ol.2016.4506>
11. Bruni L, Babarinde AA, Ortalli I, Croci S (2014): *K-D:rib dampens Hs 578T cancer cell chemoinvasion and proliferation*. *Cancer Cell Int*, 14:77.
12. Bruni L, Croci S (2014): *K-D:rib cancer cell proliferation inhibitor and DNAzyme folding promoter*. *Journal of Biological Research*, 87:2135.
13. a) THE JOURNAL OF CELL BIOLOGY, VOLUME 60, (1974). b) Pro-Q® 488 Emerald Glycoprotein Gel and Blot Stain Kit. c) GLOSSMANN, H., and D. M. NEVILLE, JR. 1971. Glycoproteins of cell surfaces. A comparative study of three different cell surfaces of the rat. *J. Biol. Chem.* 246 :6339. d) Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* (2007); 39: 44-84.
14. Paglia D E & Valentine W N. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J. Lab. Clin. Med.* 70:158-69, (1967).
15. a) Chugh R, Sangwan V, Patil SP, Dudeja V, Dawra RK, Banerjee S, Schumacher RJ, Blazar BR, Georg GI, Vickers SM, Saluja AK. A preclinical evaluation of Minnelide as a therapeutic agent against pancreatic cancer. *Sci Transl Med.* (2012) Oct 17;4(156):156ra139. doi: 10.1126/scitranslmed.3004334. PMID: 23076356; PMCID: PMC3656604. b) Zhang Y, Xu Y, Lu W, Ghergurovich JM, Guo L, Blair IA, Rabinowitz JD, Yang X. Upregulation of Antioxidant Capacity and Nucleotide Precursor Availability Suffices for Oncogenic Transformation. *Cell Metab.* (2021) Jan 5;33(1):94-109.e8. doi: 10.1016/j.cmet.2020.10.002. Epub 2020 Nov 6. PMID: 33159852; PMCID: PMC7846267. c) Arredondo-Vega, Bertha & Voltolina, Domenico. (2007). CONCENTRACIÓN, RECUENTO CELULAR Y TASA DE CRECIMIENTO.
16. Davey, M.W.; Van Montagu, M.; Inze, D.; Sanmartin, M.; Kanellis, A.; Smirnoff, N.; Benzie, I.J.J.; Strain, J.J.; Favell, D.; Fletcher, J. *Plant L-ascorbic acid: Chemistry,*

- function, metabolism, bioavailability and effects of processing. *J. Sci. Food Agric.* (2000), 80,825–860.
17. Zhao, R.N.; Yuan, Y.H.; Liu, F.Y.; Han, J.G.; Sheng, L.S. A computational investigation on the geometries, stabilities, antioxidant activity, and the substituent effects of the L-ascorbic acid and their derivatives. *Int. J. Quantum Chem.* (2013), 113, 2220–2227.
  18. Yin, X.; Chen, K.; Cheng, H.; Chen, X.; Feng, S.; Song, Y.; Liang, L. Chemical Stability of Ascorbic Acid Integrated into Commercial Products: A Review on Bioactivity and Delivery Technology. *Antioxidants* (2022), 11, 153. <https://doi.org/10.3390/antiox11010153>.
  19. Casey, J.R., Grinstein, S., and Orlowski, J. (2010). Sensors and regulators of intracellular pH. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11, 50–61. <https://doi.org/10.1038/nrm2820M>
  20. Webb, B.A., Chimenti, M., Jacobson, M.P., and Barber, D.L. (2011). Dysregulated pH: a perfect storm for cancer progression. *Nat. Rev. Cancer* 11, 671–677. <https://doi.org/10.1038/nrc3110>
  21. Persi, E., Duran-Frigola, M., Damaghi, M., Roush, W.R., Aloy, P., Cleveland, J.L., Gillies, R.J., and Ruppin, E. (2018). Systems analysis of intracellular pH vulnerabilities for cancer therapy. *Nat. Commun.* 9, 2997. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05261-X>
  22. Vélez Tobón, Gabriel Jaime, Rocha Arrieta, Yermis Carolina, Arias Sierra, Andrés Augusto, & López Quintero, Juan Álvaro. (2016). Función del sistema NADPH oxidasa en la formación de trampas extracelulares de los neutrófilos (NETs). *Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia*, 32(1), 43-56. Recuperado en 01 de octubre de 2025. [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0864-02892016000100005&lng=es&tlng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-02892016000100005&lng=es&tlng=es)

## Este preprint fue presentado bajo las siguientes condiciones:

- Los autores declaran que se obtuvieron los términos necesarios del consentimiento libre e informado de los participantes o pacientes en la investigación y se describen en el manuscrito, cuando corresponde.
- Los autores declaran que la preparación del manuscrito siguió las normas éticas de comunicación científica.
- Los autores declaran que son conscientes de que son los únicos responsables del contenido del preprint y que el depósito en SciELO Preprints no significa ningún compromiso por parte de SciELO, excepto su preservación y difusión.
- Los autores declaran que los datos, las aplicaciones y otros contenidos subyacentes al manuscrito están referenciados.
- El manuscrito depositado está en formato PDF.
- Los autores declaran que la investigación que dio origen al manuscrito siguió buenas prácticas éticas y que las aprobaciones necesarias de los comités de ética de investigación, cuando corresponda, se describen en el manuscrito.
- Los autores declaran que una vez que un manuscrito es postado en el servidor SciELO Preprints, sólo puede ser retirado mediante solicitud a la Secretaría Editorial deSciELO Preprints, que publicará un aviso de retracción en su lugar.
- Los autores aceptan que el manuscrito aprobado esté disponible bajo licencia [Creative Commons CC-BY](#).
- El autor que presenta el manuscrito declara que las contribuciones de todos los autores y la declaración de conflicto de intereses se incluyen explícitamente y en secciones específicas del manuscrito.
- Los autores declaran que el manuscrito no fue depositado y/o previamente puesto a disposición en otro servidor de preprints o publicado en una revista.
- Si el manuscrito está siendo evaluado o siendo preparando para su publicación pero aún no ha sido publicado por una revista, los autores declaran que han recibido autorización de la revista para hacer este depósito.
- El autor que envía el manuscrito declara que todos los autores del mismo están de acuerdo con el envío a SciELO Preprints.