

**Determinación de la actividad
anti-proliferativa y liberadora de
óxido nítrico de derivados de
furoxano para su potencial uso
como anti-tumorales**

Tesina de grado

Licenciatura en Bioquímica - Facultad de Ciencias

Diciembre de 2018

FLORENCIA PÉREZ LOBO

Orientadora: Dra. Paola Hernández

Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable

Contenido

Agradecimientos	4
Resumen	5
Abreviaturas	6
I. Introducción y antecedentes	7
1. Cáncer	8
1.1 Estado actual	8
2. Cáncer de cuello de útero	9
3. Cáncer de vejiga	10
4. Tratamientos utilizados en cáncer de cuello de útero y vejiga	12
5. Óxido nítrico (NO)	14
6. Actividad anti-proliferativa in vitro	18
II. Objetivos	21
Objetivo general.....	22
Objetivos específicos.....	22
III. Materiales y métodos.....	23
1. Compuestos estudiados.....	24
2. Cultivos Celulares.....	24
3. Ensayo de Griess.....	25
4. Actividad anti-proliferativa.....	26
4.1 Ensayo de resazurina	26

4.2 Ensayo de sulforodamina B	26
5. Ensayo cometa.....	27
IV. Resultados y discusión	29
1. Actividad liberadora de NO.....	30
2. Actividad anti-proliferativa.....	31
3. Ensayo cometa.....	41
V. Conclusiones.....	43
VI. Referencias	45

Agradecimientos

Agradecerles en primer lugar a mis pilares fundamentales, mis padres y mi hermana, por haberme acompañado siempre a que siguiera mis sueños, enseñarme a ser perseverante y por más piedras que haya en el camino siempre puedo seguir adelante. Gracias por su fuerza y por el esfuerzo que han hecho todos estos años para que pueda formarme y hoy al fin recibirme. Los amo con todo el corazón.

A mi tutora Paola, por ser mi mentora, por incentivar me y sacar lo mejor de mí, para que el día de mañana pueda ser una buena profesional. Gracias sobre todo por la paciencia de siempre, aunque a veces le sacara canas verdes. De todo corazón gracias. A Virginia por la amabilidad de cederme los compuestos para realizar este trabajo.

A mis compañeros de LEIG: Silvina, Diego y en el último tiempo María por la disposición cuando necesitaba una mano y la buena onda de siempre

Al Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable y Wilner Martínez por permitirme realizar mi tesina de graduación en su laboratorio.

A las hermanas que yo elegí, mis mejores amigas, Vale y Sofí. Las que siempre estuvieron a pesar de la distancia, con las que crecí y me acompañaron en este camino. Que me sacaron una sonrisa cuando no me iba bien y que bien supieron y saben festejar los logros. Gracias por bancarme siempre, hoy también estoy acá gracias a ustedes. Son todo amigas, las amo eternamente.

A mis Glendas, Cami, Rici, Romi, Boli y Noe por ser de lo mejor que me dejó Fcien. Gracias por el apoyo de siempre y soportar mis picos de estrés. Especialmente a Rici por sus apuntes, y a mi Dipolo, Cami, más que mi amiga y compañera de estudio, mi otra “Drama Queen”. Glendas, las quiero montón.

A toda la familia que no nombre, que son parte de mi vida y me acompañaron.

¡Muchísimas gracias a todos por haber sido parte de mi camino rumbo a ser Licenciada!

Resumen

El cáncer es el resultado del crecimiento descontrolado de células malignas, siendo la segunda causa de mortalidad en el mundo. El cáncer de cuello de útero es el cuarto tipo de cáncer más común en mujeres a nivel mundial para el cual aún no existe un tratamiento competente y seguro. Por otro lado, en las últimas décadas la supervivencia de pacientes con cáncer de vejiga músculo invasivo no ha mejorado y ninguna de las terapias que han sido aprobadas para otros tipos de cáncer ha sido aprobada para el tratamiento de esta patología. Por tanto, existe una gran necesidad de investigar nuevas posibilidades terapéuticas para lograr tratamientos eficaces. Debido a la importancia que se le ha dado al desarrollo de nuevos compuestos liberadores de óxido nítrico (NO) para el tratamiento del cáncer, hemos evaluado la actividad anti-proliferativa de compuestos liberadores de NO en la línea celular HeLa derivada de cáncer de cuello de útero y 253J derivada de cáncer metastásico de vejiga resistente a cisplatino. En este sentido, desarrollamos un ensayo en tándem empleando los ensayos de Griess, resazurina y sulforodamina B para la determinación de la actividad liberadora de NO y actividad anti-proliferativa a través de la medida de la actividad metabólica y la masa celular respectivamente. Adicionalmente, se evaluó el posible mecanismo de acción de los compuestos a través del ensayo cometa. Los resultados obtenidos muestran que dos de los compuestos evaluados presentaron una importante actividad anti-proliferativa y selectividad hacia las líneas celulares cancerígenas respecto al quimioterápico cisplatino. Los estudios sobre el posible mecanismo de acción de estos compuestos indican que la liberación de NO es la responsable de la actividad anti-proliferativa y que dicho radical actuaría por un mecanismo independiente del daño al ADN. Estos resultados sugieren que estos compuestos podrían considerarse nuevos líderes moleculares para el tratamiento del cáncer de cuello de útero y cáncer de vejiga.

Abreviaturas

DMEM	Dulbecco's Minimal Essential Medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
MEM	Minimum Essential Media
Óxido Nítrico	NO
RZ	Resazuirna
SFB	Suero Fetal Bovino
SRB	Sulforodamina B

I. Introducción y antecedentes

1. Cáncer

1.1 Estado actual

El cáncer es la segunda causa de muerte a nivel mundial. Este se origina por la proliferación excesiva y sin control de las células normales como resultado de la pérdida del equilibrio entre, las señales intra y extracelulares y el control del ciclo celular, generándose en consecuencia células anormales. Estas pueden seguir dividiéndose hasta llegar a formar un tumor que si resulta ser maligno, tiene la capacidad de poder propagarse a otros órganos o tejidos, mediante un proceso conocido como metástasis. Esta enfermedad es multifactorial, donde las causas que llevan a su aparición se dan por la interacción entre factores genéticos (mutación de varios proto-oncogenes) y agentes externos llamados carcinógenos (físicos, químicos y biológicos) o factores de riesgo como la edad, la mala alimentación, la inactividad física y el consumo de tabaco y/o alcohol [1].

Para el año actual las estadísticas de cáncer según Global Cancer Observatory muestran una incidencia de 18.078.957 de nuevos casos y de 9.555.027 de personas fallecidas debidas a esta patología. Las estadísticas de mortalidad e incidencia de los tipos de cáncer más frecuentes en la actualidad presentan a continuación en la figura 1 [2].

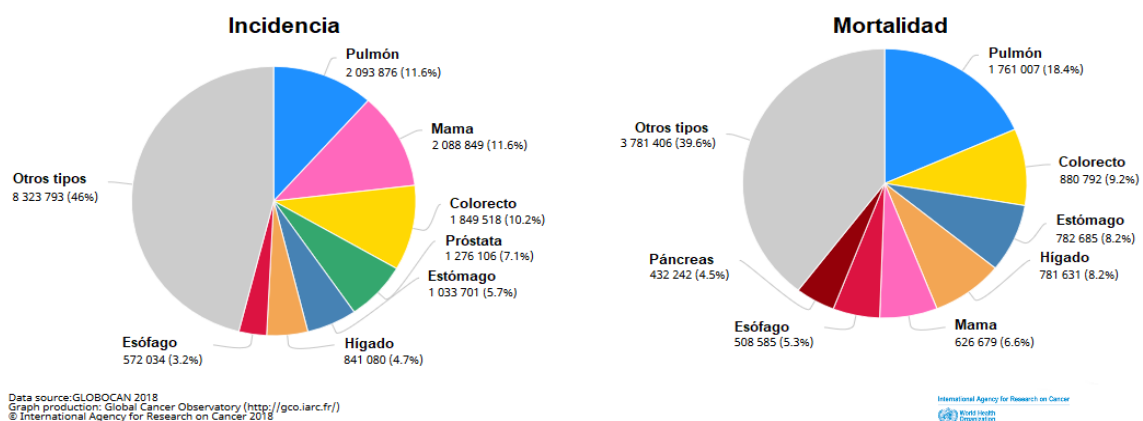


Figura 1. Estadísticas incidencia y mortalidad por cáncer a nivel mundial. Figuras tomadas de Global Cancer Observatory 2018 [2].

2. Cáncer cuello de útero

El cáncer cervical o de cuello de útero se origina en las células de la zona de transformación, compuesta por células glandulares y células escamosas (Figura 2). La principal causa de las lesiones precancerosas y del cáncer cervicouterino escamoso es la infección por el virus del papiloma humano (VPH) que puede ser persistente o crónica [3].

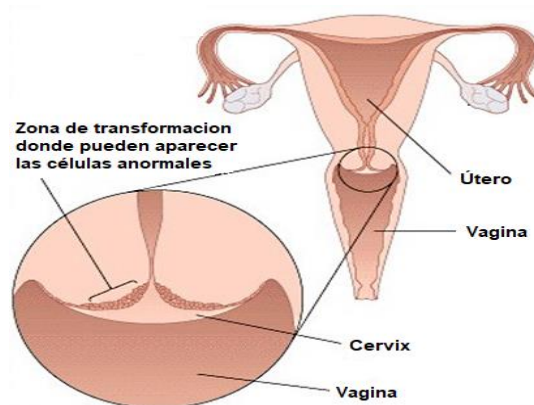


Figura 2: Anatomía del útero con la zona de transformación destacada [4]

Dentro de los tipos de cáncer que afectan a la población femenina este ocupa el cuarto lugar en incidencia y mortalidad, donde el 85% de las mujeres que padecen esta patología pertenecen a regiones en desarrollo donde existe carencia de prevención, programas de detección precoz y tratamiento [5].

A nivel mundial, este año Global Cancer Observatory determinó que fueron diagnosticadas 569.847 pacientes y 311.365 mujeres fallecieron por esta patología. Para Uruguay se determinó una incidencia de 288 nuevos casos, con un registro de mortalidad de 168 mujeres, encontrándose también que es uno de los 10 tipos de cáncer más frecuente en la población de nuestro país (Figura 3) [6].

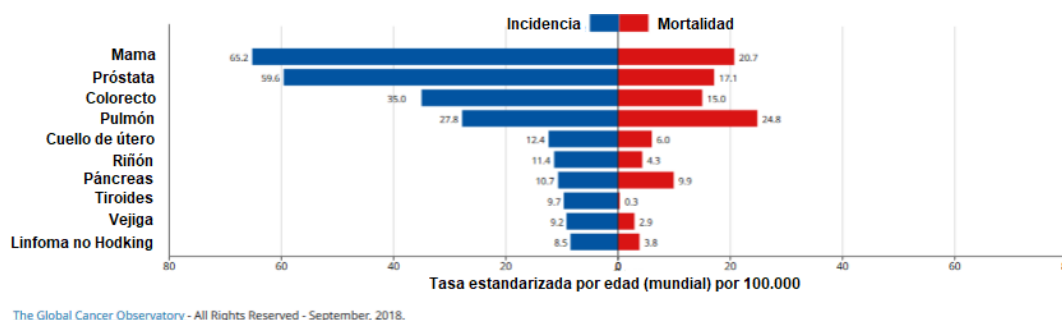


Figura 3. Estadísticas de incidencia y mortalidad de los 10 tipos de cáncer más frecuentes en Uruguay. Figuras tomadas de Global Cancer Observatory 2018 [6].

De acuerdo a estos datos, se prevé que si se sostienen las estadísticas actuales el número de defunciones aumentarán en un 45% para el año 2030 en las Américas [7].

3. Cáncer de vejiga

El cáncer de vejiga es una de las anomalías malignas más comunes del tracto urinario que afecta principalmente a los hombres. Por lo general, el cáncer de vejiga se genera por mutaciones genéticas hereditarias o mutaciones adquiridas como resultado a la exposición a factores de riesgo como el consumo de tabaco o la exposición a ciertas sustancias químicas ambientales u ocupacionales [8].

La pared de la vejiga puede dividirse en tres capas ubicándose desde afuera hacia adentro la capa serosa que recubre la región exterior del órgano, la capa muscular formada por sub capas de musculo liso y por último la capa mucosa formada por tejido conjuntivo y el epitelio de transición urinario que es el que permanece en contacto con la orina (Figura 4) [9].

La mayoría de los cáncer de vejiga son carcinomas de células transicionales pudiéndose clasificar como invasivos y no invasivos. Los de tipo no invasivos o de bajo grado, se mantienen en el epitelio de transición y no logran invadir otras capas de la vejiga. Aunque este tipo de cáncer puede presentar recidiva, por lo general no produce la muerte. Por otro lado, el cáncer de vejiga invasivo o de alto grado, es capaz de invadir la capa muscular y puede expandirse a otras zonas del cuerpo además de presentar

recidiva y por lo tanto, es el responsable de la mayoría de las muertes generadas por este cáncer [10].

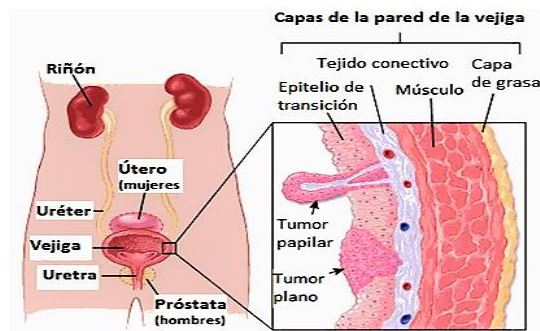
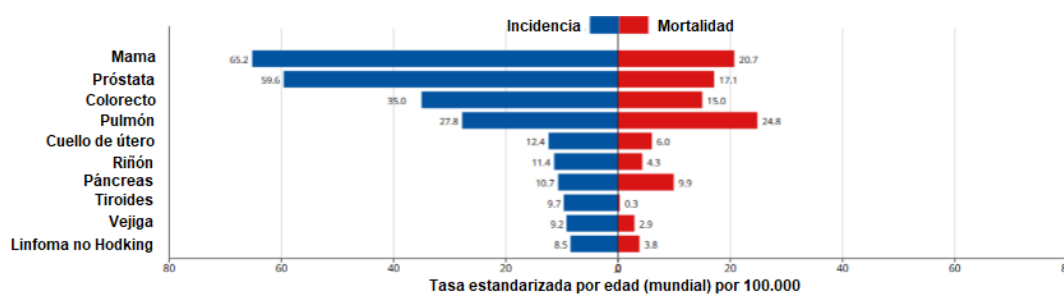


Figura 4: Anatomía del sistema urinario y capas de la vejiga. Figura tomada de la Sociedad Americana Contra El Cáncer [11].

Como muestra la figura 4, el cáncer de vejiga puede presentar dos tipos de crecimiento, tumores planos o papilares. Los papilares crecen como proyecciones hacia el interior de la vejiga, mientras que los planos no crecen. Cuando la forma de crecimiento es papilar hacia el interior o de forma plana en la capa mucosa el cáncer es de tipo no invasivo, en cambio cuando crece como papilar o plano hacia otras capas de la vejiga, se desarrollará cáncer de tipo invasivo [12].

Según las estadísticas de Global Cancer Observatory en el 2018 fueron diagnosticados en el mundo 549.393 pacientes y fallecieron 199.022 personas. Estas estadísticas determinaron para Uruguay 594 nuevos casos y 233 muertes por cáncer de vejiga, siendo uno de los 10 tipos de cáncer más frecuentes que afectan a la población (Figura 5) [13].



The Global Cancer Observatory - All Rights Reserved - September, 2018.

Figura 5: Estadísticas incidencia y mortalidad de los 10 tipos de cáncer más frecuentes en Uruguay. Figuras tomadas de Global Cancer Observatory 2018 [13].

4. Tratamientos utilizados en cáncer de cuello de útero y vejiga

En estos dos tipos de cáncer los tratamientos utilizados son: cirugía, inmunoterapia radioterapia y quimioterapia. Con respecto a la quimioterapia, puede optarse por un solo fármaco, la combinación de varios o la combinación con la cirugía y radioterapia. En el caso de cuello de útero también se utiliza la terapia dirigida en la cual se utilizan fármacos específicos que actúan bloqueando el crecimiento y la diseminación del cáncer. En vejiga además se emplea la terapia intravesical que consiste en un catéter para suministrar de forma localizada quimioterápicos o inmunoterápicos (bacilo de Calmette-Guérin BCG) [14].

Los quimioterápicos clásicos tienen la capacidad de inhibir la proliferación de las células anormales actuando sobre las diferentes fases del ciclo celular, específicamente sobre la síntesis de ADN como ARN, la síntesis proteica y en los componentes citoplasmáticos necesarios para la división celular. Estos fármacos pueden clasificarse por diferentes características, sin embargo la más utilizada es por su acción en el ciclo celular, teniendo así a los específicos y los no específicos de fase del ciclo celular. Estos últimos actúan en cualquier estadio del ciclo celular y presentan una curva dosis-respuesta lineal, por lo que cuanto más alta es la dosis recibida mayor es la cantidad de células muertas. Entre ellos se encuentran: agentes alquilantes (ej. altretamina, busulfán), complejos de platino (ej. cisplatino, carboplatino), antibióticos citostáticos (ej. mitomicina, doxorubicina) [15].

Los quimioterápicos específicos, actúan en fases concretas del ciclo celular. Este tipo de fármacos tiene una capacidad limitada para matar las células cancerosas y su efecto está determinado por la concentración en función del tiempo, esto quiere decir que si se mantiene la concentración por un determinado tiempo se logra que más células ingresen en la fase letal específica del ciclo. Los quimioterápicos de este grupo son: antimetabolitos (ej: gemcitabina, 5-fluorouracilo, metotrexato), inhibidores de la mitosis (ej: paclitaxel, docetaxel, vinblastina), inhibidores de topoisomerasas (ej: topotecán, irinotecán) [16].

Tanto en el cáncer de cuello de útero como en el cáncer de vejiga los fármacos utilizados van a depender de si el tratamiento es combinado o no con radiación y del

grado de avance que presenta la enfermedad. Cuando se utiliza la radiación en los dos tipos de cáncer se administra: cisplatino, cisplatino con 5-fluouracilo y en cáncer de vejiga también puede recibirse la combinación de mitomicina y 5-fluouracilo. Para el cáncer de vejiga si no se recibe radiación y solamente se somete a los individuos a quimioterapia se puede administrar las siguientes combinaciones: gemcitabina y cisplatino, metotrexato, vinblastina, doxorubicina y cisplatino, cisplatino, metotrexato y vinblastina, carboplatino y paclitaxel o docetaxel. Cuando el cáncer de cuello de útero ha hecho metástasis o este recidiva se procede con los siguientes quimioterápicos: cisplatino, carboplatino, paclitaxel, topotecan o gemcitabina, o combinaciones entre éstos [17].

A pesar de su gran utilidad, los quimioterápicos se caracterizan por no actuar específica y selectivamente produciendo efectos mutagénicos y citotóxicos tanto en las células tumorales como en las normales, poseen un rango terapéutico acotado y toxicidad elevada. Como resultado de lo anterior, los pacientes suelen presentar varios efectos secundarios (alteración de la medula ósea, pérdida del cabello, náuseas, vómitos, diarreas, etc.) y un elevado riesgo de adquirir resistencia al tratamiento [18].

Aunque se han observado importantes avances en investigaciones para el tratamiento del cáncer de cuello de útero como el de vejiga, estos siguen sin ser eficaces.

En el cáncer de cuello de útero se ha avanzado en técnicas para la prevención y detección, pero este cáncer sigue siendo una de las causas de muerte más importante en mujeres. En el caso del cáncer de vejiga se han realizado avances limitados en quimioterapia y aquellas que son basadas en cisplatino solo logran obtener una supervivencia media de 12-15 meses y una supervivencia a largo plazo del 5 al 15% de los pacientes [19].

Es por esto, que resulta necesaria la investigación y desarrollo de nuevos fármacos, que sean efectivos y selectivos hacia las células tumorales con el fin de lograr tratamientos que minimicen los efectos secundarios.

5. Óxido nítrico (NO)

El óxido nítrico (NO) es una molécula gaseosa que puede producirse de forma endógena por NO sintasas y desempeña un papel importante en varios sistemas biológicos como molécula de señalización o efectora [20].

A pesar de que la acción del NO ha sido controversial y ampliamente discutida, se ha demostrado que a bajas concentraciones (zona segura) el NO promueve las neoplasias, sin embargo se ha descrito que a altas concentraciones (zona de destrucción) el NO posee actividad anti-cancerígena por inducción de la apoptosis, sensibiliza los tumores a quimio, radio o inmunoterapia, revierte la resistencia a la quimioterapia y retarda las cascadas angiogénicas y metastásicas. También puede modular el ciclo celular y la respuesta inmune, así como efectuar una acción genotóxica, actuando sobre el ADN o las proteínas que lo reparan (Figura 6) [21].



Figura 6: Respuesta tumoral a diferentes concentraciones de NO. Zona segura: Concentración óptima para la proliferación de las células tumorales. Zona de inhibición: Concentración intratumoral extremadamente baja de NO inhibe el crecimiento tumoral. Zona de destrucción: Concentraciones muy elevadas producen la muerte de las células tumorales [22].

El NO participa y controla vías que son indispensables para la supervivencia de las células tumorales a través de reacciones de S-nitrosilación y nitración de tirosinas. A través de este mecanismo, el NO activa de la proteína supresora de tumores p53

asociada a la inducción de la apoptosis celular, inhibe la activación del factor de transcripción NF- κ B, la invasión y metástasis y la resistencia a la muerte celular. El NO también interviene en la remodelación de la cromatina por regular el balance y la actividad de HDACs encargadas de la regulación de la expresión génica, inhibe y regula la activación del factor de transcripción inducible por hipoxia HIF-1 α . Asimismo, el NO puede actuar sobre el proteasoma promoviendo la degradación de elementos anti-apoptóticos, como también sobre las mitocondrias induciendo la liberación de la proteína Smac y citocromo c aumentando la permeabilidad de la misma y conduciendo a la apoptosis. Por último, el NO tiene acción sobre el receptor Fas del cual conduce a la muerte celular (Figura 7) [23].

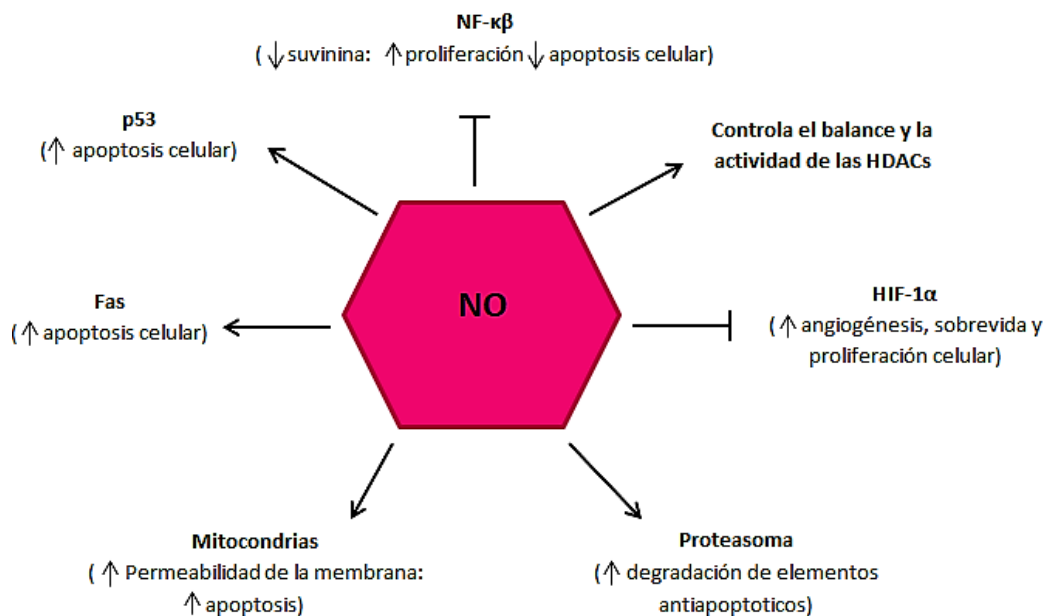


Figura 7: Esquema de la acción generada por el NO sobre células cancerígenas.

Las elevadas concentraciones de NO pueden ser producidas por compuestos liberadores de NO, como furoxanos y benzofuroxanos, los cuales han sido ampliamente descritos como compuestos con destacada actividad anti-proliferativa en diversas líneas tumorales (Figura 8) [24].

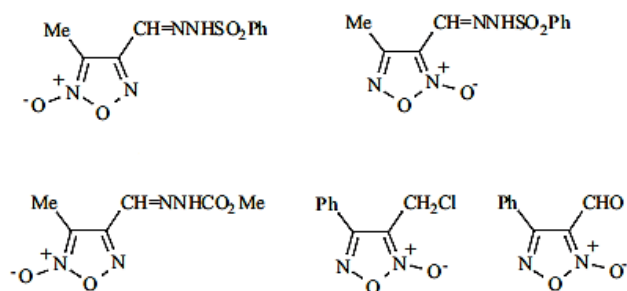


Figura 8: Furoxanos con actividad anti tumoral [24]

Así mismo también se ha observado que el tocoferol y análogos de tocoferol presentan actividad anti-cancerígena mediante la inducción de la apoptosis, la inhibición del crecimiento celular y de la angiogénesis [25]. En este sentido, el grupo de investigación de la Dra. López se desarrolló previamente moléculas híbridas compuestas por análogos de tocoferol y furoxanos liberadores de NO [26], las cuales presentaron una importante actividad anti-proliferativa en diferentes líneas tumorales (Figura 9) [27].

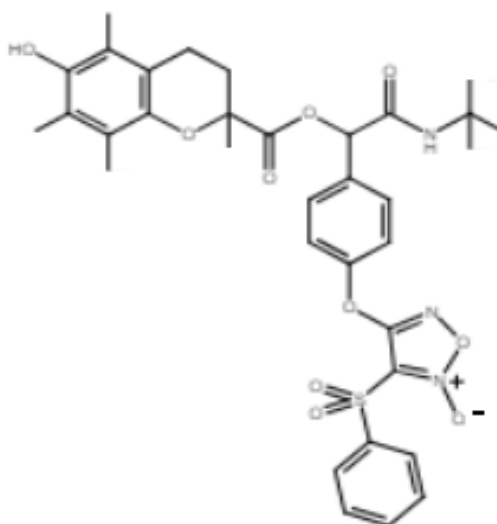


Figura 9: Compuesto híbrido liberador de NO con actividad anti proliferativa [27].

Debido a que se ha demostrado que los agentes liberadores de NO inducen la radio y quimiosensibilización de células tumorales, se ha utilizado la combinación de

liberadores de NO con quimioterápicos logrando inhibir el crecimiento del tumor y dando una mejoría del tratamiento en ciertos tipos de cáncer son resistentes a quimioterápicos [28].

En el caso de cáncer de cuello de útero, se ha descrito que donantes de NO logran sensibilizar las células a la apoptosis, actuando sobre un aumento de la expresión del receptor de membrana Fas, e induciendo la muerte celular a través de la permeabilización de la membrana de las mitocondrias, la liberación de citocromo c y fragmentación del ADN. Si bien el virus del HPV está asociado a una mayor liberación de NO, se ha visto que la administración de agentes liberadores de NO inhiben el desarrollo y proliferación de las células tumorales, aumentan la apoptosis e inhiben la expresión del ARNm del HPV 18 y de las proteínas oncogénicas E6 y E7 [29].

Recientemente, un estudio en diferentes compuestos liberadores de NO mostró importantes resultados para su uso en el tratamiento del cáncer de vejiga, ya que los mismos pueden desencadenar la apoptosis a través de: la inducción de iNOs generando concentraciones elevadas de NO, la generación de especies reactivas del oxígeno, y aumentando de la expresión de proteínas pro apoptóticas e inhibiendo proteínas anti-apoptóticas. En este sentido, se ha observado que en este tipo de cáncer la activación del factor NF- κ B induce la sobreexpresión de la proteína anti-apoptótica survivina involucrada en la proliferación y una resistencia a la apoptosis [30].

La bioquímica del NO es compleja, por lo que su detección y cuantificación de forma precisa es importante para poder comprender su papel en el cáncer. Como el NO tiene una semivida muy corta y las técnicas para su detección se han basado en la cuantificación de sus metabolitos, el nitrito y nitrato, aunque el NO se oxida mayoritariamente a nitrito [31].

Diferentes técnicas pueden utilizarse para detectar los metabolitos como: HPCL, fluorescencia, quimioluminiscencia, detección de derivados de NO (sin ser nitrito o nitrato) por diversas técnicas etc [32]. Un método muy utilizado para cuantificar los principales metabolitos del NO es la reacción de Griess. Esta reacción se produce en dos pasos donde el agente nitrosante N_2O_3 que se puede generar a partir del nitrito

acidificado o por la auto oxidación del NO, reacciona con el compuesto sulfanilamida produciendo un derivado de diazonio. Este compuesto intermedio luego reacciona con N-1-naftiletilendiamina (NED) dando un producto diazo de color, el cual absorbe a 540 nm (Figura 10) [33].

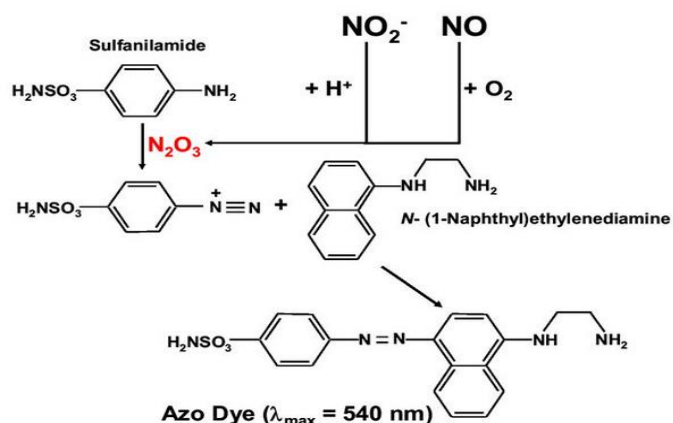


Figura 10: Reacción de Griess [34].

Esta reacción se caracteriza por ser simple, tener una viabilidad analítica fácil y económica, ser rápida, además de que puede ser utilizada en análisis de rutina de varias muestras [35].

Actividad anti-proliferativa in vitro.

Hoy en día la mayoría de los ensayos para determinar la viabilidad celular se basan en la evaluación de la integridad de la membrana celular, conteo de células, cuantificación de la masa proteica o medida de la actividad metabólica de las células viables [36].

Mediante el ensayo de resazurina las células viables son capaces de reducir el compuesto resazurina (colorante no fluorescente, azul) a la resorufina (colorante fluorescente rosa) siendo la fluorescencia proporcional al número de células metabólicamente activas y viables (Figura 11) [36].

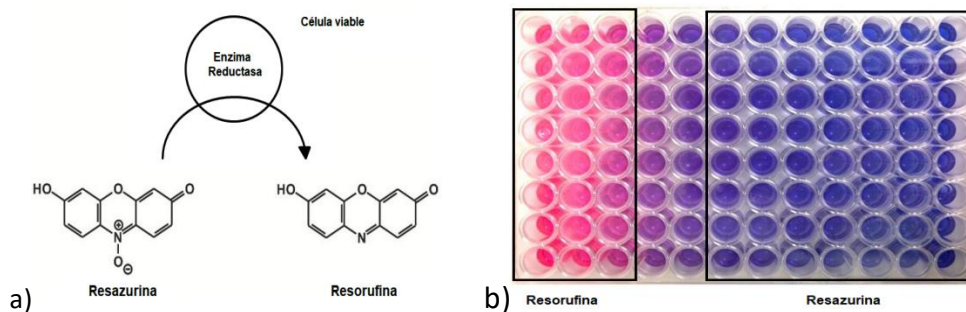


Figura 11: a) Reducción enzimática de la resazurina a resorufina. b) Cultivo celular donde se puede ver el cambio de color por la reducción de la resazurina (azul) a resorufina (rosa) [37].

Por otra parte, la masa proteica total de un cultivo celular, puede ser cuantificada mediante el ensayo de sulforodamina B. Este compuesto (Figura 12), se une a aminoácidos básicos de las proteínas celulares y a partir de una cuantificación colorimétrica se puede estimar la cantidad proteica que contiene la muestra la cual es proporcional al número de células presentes [38].

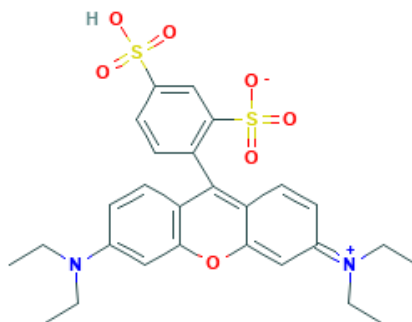


Figura 12: Estructura química del compuesto sulforodamina B [39].

En la actualidad, ambos ensayos son muy utilizados ya que presentan una serie de ventajas como la simplicidad, versatilidad, reproducibilidad, sensibilidad y bajo costo [40].

Si bien hay que tener en cuenta determinados parámetros a la hora de elegir un método como la especificidad, sensibilidad, la duración del ensayo y costos, los ensayos que se utilizan en la actualidad cuantifican un solo parámetro por lo que son

limitados. Es por esto que en algunas ocasiones la elección del citotóxico a llevar a cabo se torna compleja [41]. Recientemente, Silva y colaboradores han descrito un ensayo en tándem el cual cuantifica la actividad metabólica y masa celular en fibroblastos de piel utilizando la misma muestra celular mediante las técnicas de resazurina y sulforodamina B respectivamente. Los resultados obtenidos en este estudio, mostraron las ventajas que poseen los ensayos por separado, así como también su utilidad cuando son realizados tándem ya que de esta forma se evita la variación asociada a ensayos independientes, minimiza los tiempos de cultivo tiempo y reducen los costos [42].

Actualmente es necesario desarrollar ensayos simples, rápidos y reproducibles para evaluar compuestos con capacidad liberadora de NO como potenciales agentes anti-cáncer. Es por esto que en este trabajo desarrollamos una metodología en tándem que incluye la cuantificación de la liberación de NO por la técnica de Griess y la determinación de la viabilidad celular mediante resazurina y sulforodamina B de una serie de furoxanos e híbridos de análogos de tocoferol-furoxano como potenciales agentes anti-tumorales para el tratamiento del cáncer de cuello de útero y de vejiga. Asimismo, en este trabajo se estudió el posible mecanismo de acción de los compuestos que mostraron con mejor actividad biológica.

II. Objetivos

Objetivo general

Determinar la actividad liberadora de óxido nítrico y anti-proliferativa de derivados de furoxano e híbridos análogos de tocoferol-furoxano mediante el desarrollo de un ensayo en tándem para su potencial uso como agentes anti-cáncer y su posible mecanismo de acción.

Objetivos específicos

- Evaluar la actividad liberadora de óxido nítrico y anti-proliferativa de derivados de furoxano, compuestos híbridos análogos del tocoferol-furoxano y un derivado furazano a través de la puesta a punto de un ensayo en tándem que comprende 3 técnicas: Griess, resazurina, sulforodamina B, en la línea celular derivada de cáncer de cuello de útero HeLa y en la línea celular 253J derivada de cáncer metastásico de vejiga.
- Determinar la actividad anti-proliferativa de los compuestos en la línea celular normal HaCat y la selectividad de los compuestos hacia las células tumorales.
- Determinar el posible mecanismo de acción de los compuestos con mejor actividad anti-proliferativa.

III. Materiales y métodos

1. Compuestos estudiados

Para este estudio fueron seleccionados dos derivados de furoxano (FNO y FNO1), cuatro compuestos híbridos análogos del tocoferol-furoxano (FNO5, FNO5d, FNO6 y FNO6d) y un derivado de furazano (FN6). Estos compuestos fueron amablemente cedidos por la Dra. Gloria Virginia López del Departamento de Química Orgánica de la Facultad de Química. La figura (13) muestra las estructuras químicas de los compuestos evaluados en el presente estudio: derivados de furoxano (FNO y FNO1), híbridos análogos del tocoferol-furoxano (FNO5, FNO5d, FNO6 y FNO6d) y un derivado furazano (FN6)

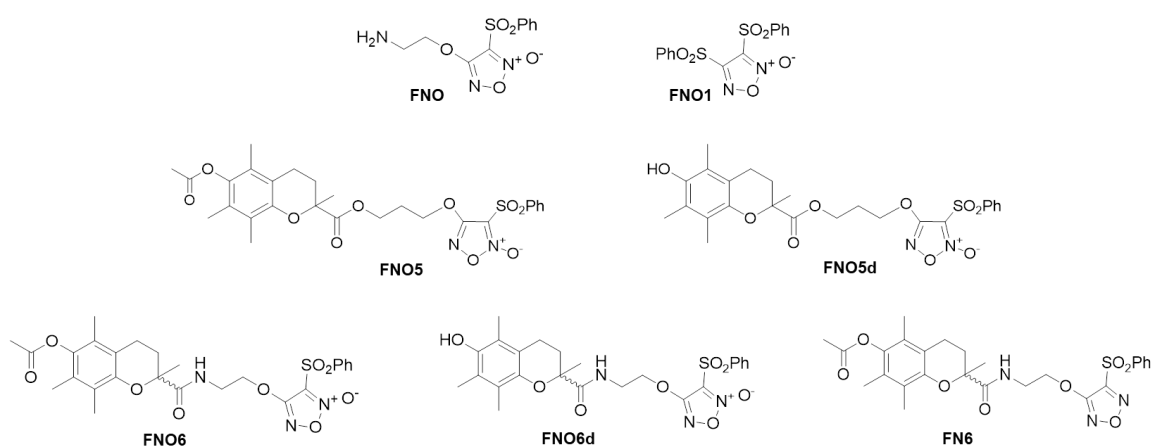


Figura 13: Estructura de furoxanos (FNO y FNO1), híbridos análogos de tocoferol-furoxano (FNO5, FNO5d, FNO6 y FNO6d) y furazano (FN6) evaluados como potenciales agentes anti-tumorales.

2. Cultivos celulares

Se utilizaron las siguientes líneas celulares: 253J (derivada de cáncer metastásico de vejiga y resistente a cisplatino), HeLa (derivada de cáncer de cuello de útero) y HaCaT (queratinocitos humanos inmortalizados) las cuales se cultivaron utilizando los medios de cultivo McCoy 5a, MEM y DMEM respectivamente, suplementados con 10 % de suero fetal bovino y 1% de penicilina-estreptomicina. Los cultivos celulares fueron crecidos en botellas para cultivo celular de 25 cm² en una incubadora a 37 °C y 5% de CO₂.

Para realizar la siembra de células en placas de 96 pocillos, se partió de cultivos celulares en fase exponencial a los cuales se les retiró el medio de cultivo, se lavó con PBS, se adicionó la tripsina y se incubó por 5 minutos a 37 °C. Pasado este tiempo, la suspensión celular se neutralizó con medio de cultivo completo y se tomó una alícuota de la suspensión celular para realizar el recuento en cámara de Neubauer. A continuación, se realizaron los cálculos correspondientes para obtener las densidades celulares deseadas. Las placas de 96 pocillos se sembraron con células 253J (5.000 células/pocillo) HeLa (8.000 células/pocillo) o HaCaT (8.000 células/pocillo) en 100 µL de medio de cultivo. Las células se incubaron por 24 hs, a 37 °C y 5 % CO₂. Los compuestos a evaluar se disolvieron en DMSO para obtener las soluciones stock a diferentes concentraciones (5.00, 2.50, 1.25, 0.63, 0.31, 0.16 mM). A partir de estos stocks, se prepararon las soluciones de los compuestos en medio de cultivo completo a las concentraciones a evaluar (50.00, 25.00, 12.50, 6.25, 3.13, y 1.56 µM) de forma que la concentración final de DMSO en cada uno de ellos fue del 1%. Se retiró el medio de cultivo de la placa de 96 pocillos y se adicionaron 200 µl por pozo de cada solución por triplicado. Los controles que se utilizaron fueron medio de cultivo, DMSO 1 % y el quimioterápico cisplatino (10 – 320 µM). El cultivo celular se incubó nuevamente por 1.5, 3 y 24 hs a 37 °C y 5 % CO₂.

3. Ensayo Griess

La determinación de la liberación de NO en el medio celular por parte de los compuestos a 1.5, 3 y 24 horas, fue desarrollada a través de la técnica de Griess. Esta técnica consiste en la cuantificación de uno de los productos primarios de descomposición de NO, el nitrito (NO₂⁻). Para esto, una vez transcurrido el tiempo de incubación, tomaron 50 µl de cada pocillo y se transfirieron a una nueva placa de 96 pocillos, con la que se lleva a cabo el ensayo de Griess. Paralelamente se realizó una curva de calibración con nitrito de sodio (NaNO₂) 0.1 M en agua. Utilizando el estándar se prepara la curva de calibración realizando una dilución 1/1000 para obtener una concentración de 100 µM. Se designaron 3 columnas en una placa de 96

pozos, en las cuales se realizaron diluciones seriadas para generar la curva de referencia a las concentraciones 100.0, 50.0, 25.0, 12.5, 6.3, 3.1, 1.6, 0 μ M.

La ecuación de la recta obtenida se utilizó para determinar la concentración de NO liberado por cada uno de los compuestos. Para llevar a cabo la reacción de Griess se añadió 50 μ L de la solución de sulfanilamida (1% de sulfanilamida en 5% de ácido fosfórico) a la placa con las muestras de medio de cultivo y la curva de referencia y se dejó incubar por 10 minutos protegido de la luz. Luego de la incubación, se prosiguió con la adición de 50 μ L solución de NED (0.1% de N-1-naftiletildiamina di hidrocloreuro en agua) y se incubó por 10 minutos protegido de la luz. Se midió la absorbancia a 540 nm en el espectrofotómetro de microplacas Varioskan Flash dentro de los 30 minutos luego de la última incubación.

4. Actividad anti-proliferativa

4.1 Ensayo de Resazurina

Se preparó una solución 0.025 mg/mL de resazurina de a través de la dilución de 250 μ L de la solución stock 1mg/mL en 10 mL de PBS. Se descartó el medio de cultivo remanente en la placa y se agregaron 100 μ l de la solución de resazurina a cada pocillo, dejando al menos 3 pocillos con PBS como control. A continuación, la placa se incubó por 4hs protegida de la luz a 37 $^{\circ}$ C y 5 % CO₂ y se midió la fluorescencia (excitación 530 nm y emisión 590 nm) utilizando el espectrofotómetro de microplacas Varioskan Flash. El % de inhibición de crecimiento se determinó de la siguiente manera: % Inhibición de crecimiento= $((1-RFU \text{ muestra})/RFU \text{ DMSO})*100$

4.2 Ensayo de sulforodamina B

Luego de realizar el ensayo anterior, se descartó la solución de resazurina y se lavó la placa con 200 μ L de PBS a temperatura ambiente. Las células se fijaron con una solución de ácido acético en metanol 1% previamente enfriada y se incubó -20 $^{\circ}$ C durante toda la noche. Posteriormente se descartó la solución fijadora y se dejó secar

la placa a 37 °C por 1 hora. Se adicionan 100 µL por pozo de la solución de sulforodamina 0.5% en una solución de ácido acético al 1% en agua MiliQ. La placa se incubó por 1 hora a 37°C. A continuación se descartó la solución de sulforodamina y se lavó rápidamente 3 veces la placa con 200 µL de una solución de ácido acético al 1% en agua MiliQ. La placa se dejó secar a 37 °C durante 1 hora. El colorante remanente en los pocillos se disolvió en 100 µL de Tris-base 10 mM, pH 10.5. Para una mejor y más rápida disolución se llevó la placa a un shaker giratorio durante 5 minutos y se leyó la absorbancia a 510 nm y 620 nm en el espectrofotómetro de microplacas Varioskan Flash. El % de inhibición de crecimiento se determinó de la siguiente manera:

$$\% \text{ Inhibición de crecimiento} = ((1 - \text{Abs. muestra}) / \text{Abs. DMSO}) * 100$$

5. Ensayo cometa

Se sembraron en una placa de 96 pocillos las líneas celulares 253J y HeLa con una densidad de 5.000 y 8.000 células por pozo respectivamente y se permitió la adherencia de las células a través de la incubación por 24 hs a 37 °C y 5 % CO₂. Al día siguiente se eliminó el medio de cultivo y se adiciono 100 µL de cada uno de los compuestos en DMSO a 50 µM. Las soluciones fueron preparadas de acuerdo a como se indicó anteriormente de forma que el porcentaje de DMSO en la placa fue del 1%. Cada compuesto fue evaluado por sextuplicado y se incluyeron los siguientes controles: H₂O₂ a 100 µM, medio de cultivo y DMSO 1%. Posteriormente, la placa se incubó durante 3 horas a 37 grados y 5% de CO₂. Una vez finalizada la incubación, se descartó el medio de cultivo de la placa, se levantaron las células con tripsina y se generó un pool para cada condición en tubos eppendorf los cuales que se colocaron inmediatamente en hielo. Las células se centrifugaron 5 min a 1200 rpm y el sedimento celular se re-suspendió en 40 µl de PBS. Luego se tomaron 20 µL de la suspensión de células y se mezclaron con 80 µL de 0,5% agarosa de bajo punto de fusión a 37°C en un tubo de 0.5 mL y los 100 µL se adicionaron a cada uno de los portaobjetos en forma de *smear*. Inmediatamente estos se cubrieron con un cubreobjeto y se incubaron a 4°C durante 10 minutos. Los portaobjetos se colocaron en coplins conteniendo buffer de lisis (pH 10, NaCl 2.5 M, Na₂EDTA 100 mM, Trizma-

HCl 10 mM y Triton X-100 al 1%) previamente enfriado a 4 °C y se incubaron durante 1 hora a 4 °C. Posteriormente las muestras fueron lavadas con PBS durante 5 minutos. Se armó la cuba electroforetica y se agregó en ella el buffer de electroforesis (pH 13, NaOH 300 mM y Na₂EDTA 1 mM). Los portaobjetos fueron cubiertos con buffer de electroforesis por un tiempo de 15 minutos con la fuente apagada para permitir el desenrollamiento del ADN y se llevó a cabo la electroforesis en oscuridad a 0,7 V y 300 mA durante 15 minutos. Al terminar los portaobjetos fueron lavados con buffer de neutralización (pH 7,5, Tris-HCl 0,4 M) 3 veces durante 5 minutos y se guardaron en cámara húmeda hasta el día siguiente.

Finalmente, las muestras fueron teñidas con 50 µL de yoduro de propidio (10 µg/mL) y se les colocó un cubreobjeto. Las muestras se analizaron usando el programa informático Comet Image (MetaSystems). Se midieron al menos 50 núcleos por portaobjetos (dos portaobjetos por tratamiento o control). El daño se cuantificó como el momento de la cola del cometa Olive, que representa el grado de daño del ADN en células individuales (el producto de la fracción de ADN migrado y la distancia entre la mediana de la cabeza y la mediana de la cola del cometa).

IV. Resultados y discusión

1. Actividad liberadora de NO

Se cuantificó la liberación de óxido nítrico en el medio celular de cultivos HeLa y 253J luego de la incubación con los compuestos a 50 μ M durante 1.5, 3 y 24 hs. Los resultados fueron expresados como la tasa de producción de NO_2^- respecto al control DMSO (Figura 14).

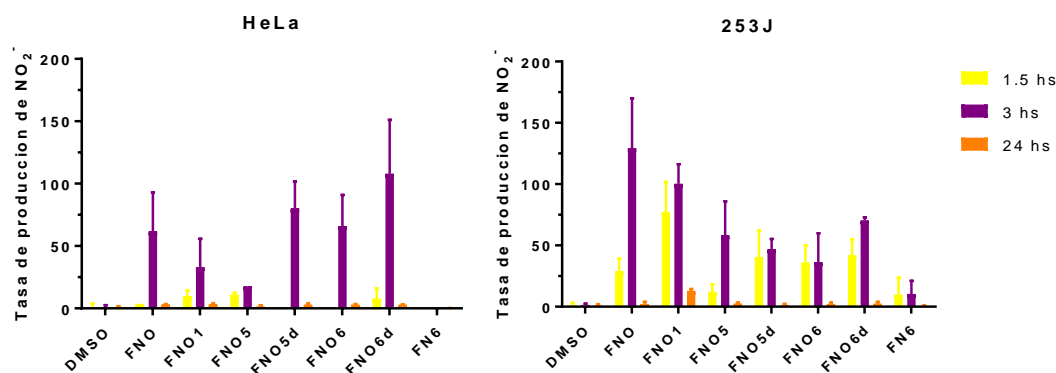


Figura 14: Tasa de producción de NO_2^- en células HeLa y 253J tratadas con 50 μ M de compuestos durante 1.5, 3 y 24 hs.

Para las células HeLa, puede verse un pico máximo de liberación de NO a las 3hs de incubación con los compuestos. De los 7 compuestos evaluados, el que presenta mayor liberación es el compuesto FNO6d, donde la tasa de producción de NO por parte de este compuesto es de unas 100 veces mayor que el control. Por otra parte, los compuestos FNO, FNO1, FNO5d y FNO6 niveles de NO entre 25-75 veces mayor al control DMSO.

En la línea celular 253J se observa liberación de NO a partir de las 1.5 hs, niveles que se mantienen estables o incrementan mostrando un pico de liberación a las 3hs de incubación. En este caso, se observa que los compuestos que mayor liberación de NO presentaron fueron FNO y FNO1 superando la liberación del control en más de 100 veces. Por su parte los otros compuestos FNO5, FNO5d, FNO6 y FNO6d mostraron niveles de NO entre 50-75 veces más que el control DMSO.

Puede observarse que para las dos líneas celulares se puede ver que el compuesto deoxigenado FN6 carece de actividad liberadora de óxido nítrico, tal como como era de esperarse de acuerdo a su estructura química.

2. Actividad anti-proliferativa.

La actividad anti-proliferativa fue determinada mediante el ensayo de resazurina seguido por el ensayo de sulforodamina B. El ensayo de resazurina cuantifica la actividad metabólica celular, mientras que el ensayo de sulforodamina B cuantifica el contenido proteico. Para ello las líneas celulares cancerígenas (253J y HeLa) y la línea celular normal (HaCaT) fueron incubadas por 24 hs en presencia de los compuestos (1.6 a 50.0 μM) y el control positivo cisplatino (10 – 320 μM). A partir de las RFU (unidades relativas de fluorescencia) obtenidas en el ensayo de resazurina y la absorbancia obtenida en el ensayo de sulforodamina B, se determinó el porcentaje de inhibición del crecimiento celular respecto a las células control tratadas con DMSO al 1% y se graficaron las curvas dosis-respuesta con los porcentajes de inhibición versus concentración de los compuestos. A partir de dichos gráficos, se calcularon los valores de IC_{50} correspondientes a la concentración de compuesto que inhibe el 50% del crecimiento celular mediante análisis de regresión lineal para los ensayos de resazurina (tabla 1) y sulforodamina B (tabla 2). Posteriormente con las IC_{50} calculadas para las líneas celulares cancerígenas y la normal, se determinó el índice de selectividad IS (selectividad de determinado compuesto hacia una línea celular cancerígenas respecto a la normal) datos que son indicados en las respectivas tablas 1 y 2.

Tabla 1. Valores correspondientes a las IC₅₀ en $\mu\text{M} \pm$ desviación estándar para las líneas: HeLa, 253J y HaCaT determinadas por el ensayo de resazurina.

Compuesto	HeLa	253J	HaCaT	IS	
				(HaCaT/HeLa)(HaCaT/253J)	
FNO	12.19 \pm 1.15	7.60 \pm 1.14	34.46 \pm 1.17	2.83	4.53
FNO1	4.53 \pm 1.22	7.30 \pm 1.19	4.58 \pm 1.17	1.01	0.63
FNO5	10.14 \pm 1.14	4.94 \pm 1.22	25.12 \pm 1.13	2.48	5.09
FNO5d	4.69 \pm 1.16	8.32 \pm 1.19	6.70 \pm 1.23	1.43	0.81
FNO6	4.75 \pm 1.14	11.12 \pm 1.25	5.68 \pm 1.13	1.20	0.51
FNO6d	3.01 \pm 1.16	5.32 \pm 1.16	4.83 \pm 1.15	1.61	0.91
FN6	> 50.00	> 50.00	29.63 \pm 1.08	-	-
Cisplatino	17.81 \pm 1.08	86.82 \pm 1.06	23.97 \pm 1.10	1.35	0.28

Tabla 2. Valores correspondientes a las IC₅₀ en $\mu\text{M} \pm$ desviación estándar para las líneas celulares: HeLa, 253J y HaCaT determinadas por el ensayo de sulforodamina B.

Compuesto	HeLa	253J	HaCaT	IS	
				(HaCaT/HeLa)(HaCaT/253J)	
FNO	9.67 \pm 1.15	5.65 \pm 1.18	35.38 \pm 1.19	3.66	6.26
FNO1	3.14 \pm 1.13	5.47 \pm 1.09	3.60 \pm 1.16	1.15	0.66
FNO5	8.53 \pm 1.13	4.44 \pm 1.28	22.25 \pm 1.16	2.61	5.01
FNO5d	4.56 \pm 1.16	6.25 \pm 1.21	5.93 \pm 1.23	1.30	0.95
FNO6	3.96 \pm 1.19	10.38 \pm 1.32	5.33 \pm 1.16	1.41	0.54
FNO6d	2.97 \pm 1.16	3.37 \pm 1.19	4.06 \pm 1.14	1.37	1.21
FN6	40.87 \pm 1.21	> 50.00	15.22 \pm 1.13	0.37	-
Cisplatino	10.47 \pm 1.12	63.84 \pm 1.09	21.55 \pm 1.07	2.06	0.34

De acuerdo a los resultados obtenidos descritos en las tablas, podemos observar que los métodos empleados resazurina el cual mide actividad metabólica y sulforodamina B el cual permite cuantificar el contenido proteico, mostraron resultados similares en cuanto a la actividad anti-proliferativa de los compuestos evaluados. Sin embargo, tal como se ha descrito en algunos trabajos, la sulforodamina B parece ser algo más sensible que la resazurina, y esto puede observarse en los valores de IC_{50} obtenidos.

Se determinó la correlación entre los dos métodos empleados resazurina y sulforodamina B graficando los resultados de IC_{50} obtenidos para ambos ensayos (Figura 15).

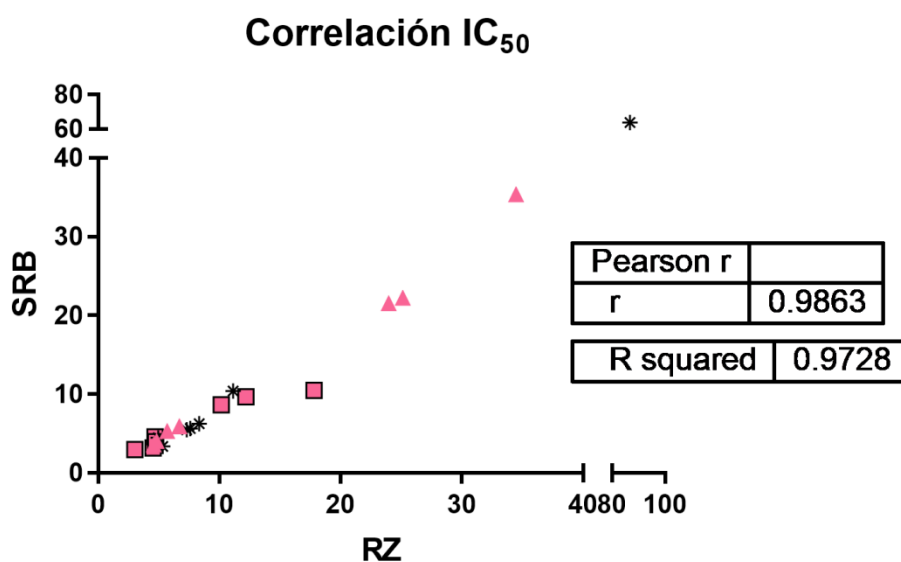


Figura 15. Correlación entre los métodos de resazurina y sulforodamina B en líneas celulares HeLa (\square), 253J (*) y HaCaT (\blacktriangle).

Podemos observar que existe una excelente correlación entre ambos ensayos y este resultado se ve apoyado por el coeficiente de Pearson de 0.9863 y un R^2 de 0.9728.

A continuación se realizará una breve discusión en base a la estructura química y la actividad biológica observada presentando los gráficos de dosis-respuesta y una comparación con el quimioterápico cisplatino.

El furoxano FNO presenta como sustituyente un grupo amino capaz de interactuar a través de enlaces de hidrógeno o donando electrones, mientras que el furoxano FNO1 presenta un grupo sulfona con propiedades electrón atrayentes. De acuerdo a los valores de IC_{50} obtenidos se observa que el furoxano FNO mostró una importante actividad anti-proliferativa hacia la línea celular 253J, mientras que para HeLa este compuesto presenta una actividad moderada (Figura 16).

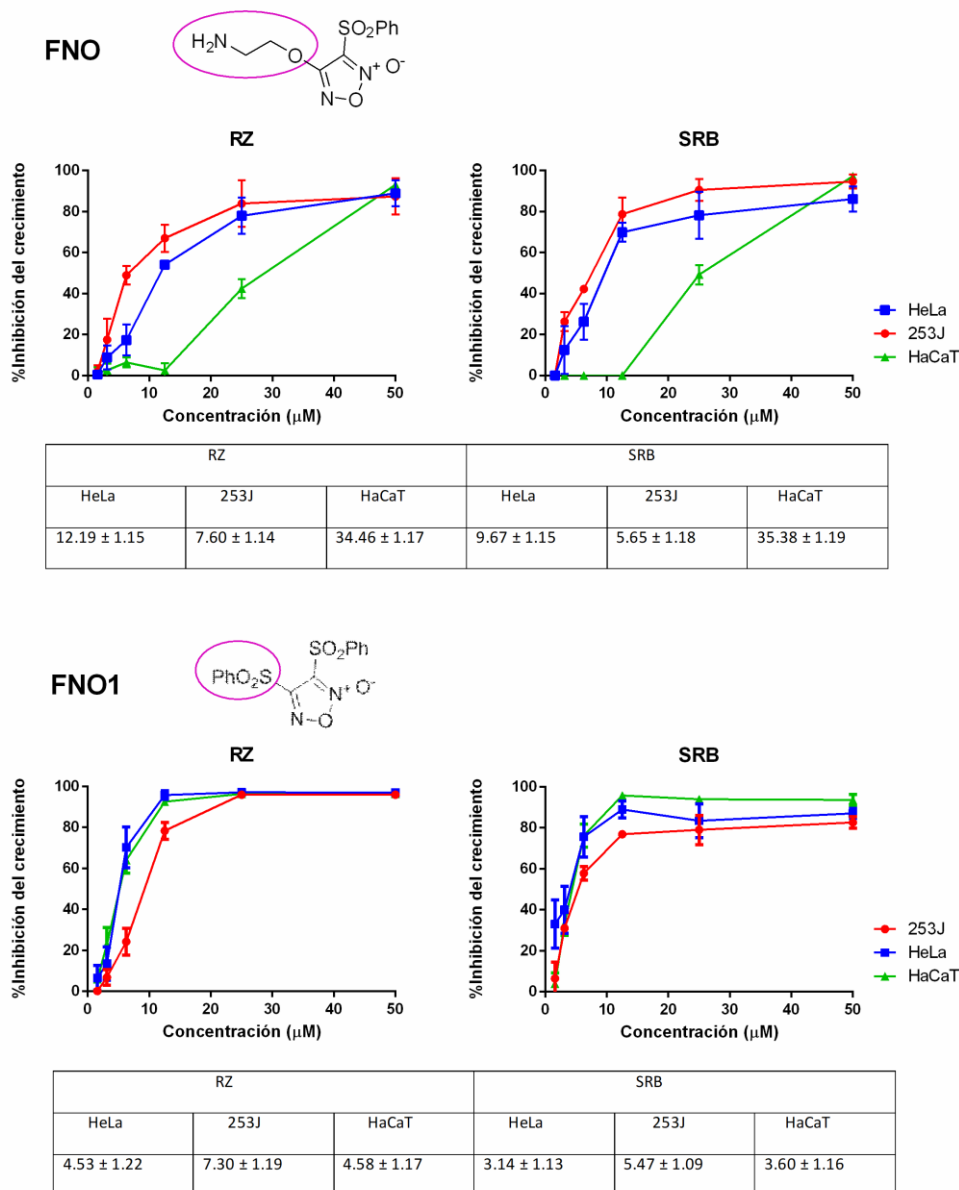


Figura 16. Estructuras de FNO y FNO1 y sus gráficos de dosis-respuesta (% inhibición del crecimiento vs concentración en μM) y valores de IC_{50} obtenidos mediante resazurina (izquierda) y sulforodamina B (derecha) en las líneas celulares HeLa, 253J y HaCat.

Este compuesto presentó selectividad hacia las líneas celulares cancerígenas, ya que si observamos los gráficos, en el caso de la línea celular normal HaCaT para obtener una disminución del crecimiento la concentración usada debería ser mayor a 12.5 μM , mientras que en las líneas celulares cancerígenas para esa concentración ya se observa un porcentaje de inhibición entre el 60-80%. Esto también se ve reflejado en los valores de IC_{50} mostrados en las tablas de la figura 16. En cuanto al compuesto FNO1, este presenta una importante actividad anti-proliferativa para ambas líneas celulares cancerígenas, sin embargo, este compuesto no resultó ser selectivo ya que afectó también a la línea celular normal HaCaT, tal como puede observarse en el gráfico de la figura 16 y los valores de IC_{50} obtenidos. Si comparamos estos resultados con los obtenidos para el fármaco de referencia cisplatino, podemos observar que los compuestos evaluados en nuestro trabajo poseen mayor selectividad hacia las células tumorales. Por ejemplo, en la tabla 1 (página 32) podemos observar que en el caso de la línea celular 253J el compuesto FNO es 18 veces más selectivo y el compuesto FNO1 2 veces más selectivo que el quimioterápico cisplatino. Para la línea celular HeLa el compuesto FNO fue 2 veces más selectivo hacia la línea tumoral respecto al cisplatino. Dado a que estos compuestos son potentes liberadores de óxido nítrico y que sólo se diferencian en sus sustituyentes, se puede observar que el grupo electrón dador amino de FNO afecta principalmente a la línea celular 253J mientras que en el caso de FNO1 la presencia de la sulfona con propiedad electrón atrayente ejerce una acción anti-proliferativa mayor sobre la línea celular HeLa.

Con respecto a FNO5 y FNO5d, estos compuestos presentaron una importante actividad anti-proliferativa en las líneas celulares cancerígenas HeLa y 253J. De acuerdo a los índices de selectividad calculados (Tablas 1 y 2, página 32) podemos observar que el compuesto FNO5, el cual presenta un grupo fenol protegido (Figura 17), mostró para HeLa y 253J un IS de casi 2 veces y 15 veces superior al del quimioterápico cisplatino respectivamente. Por el contrario, el compuesto FNO5d, que contiene un grupo fenol libre, no mostró selectividad hacia las líneas celulares cancerígenas.

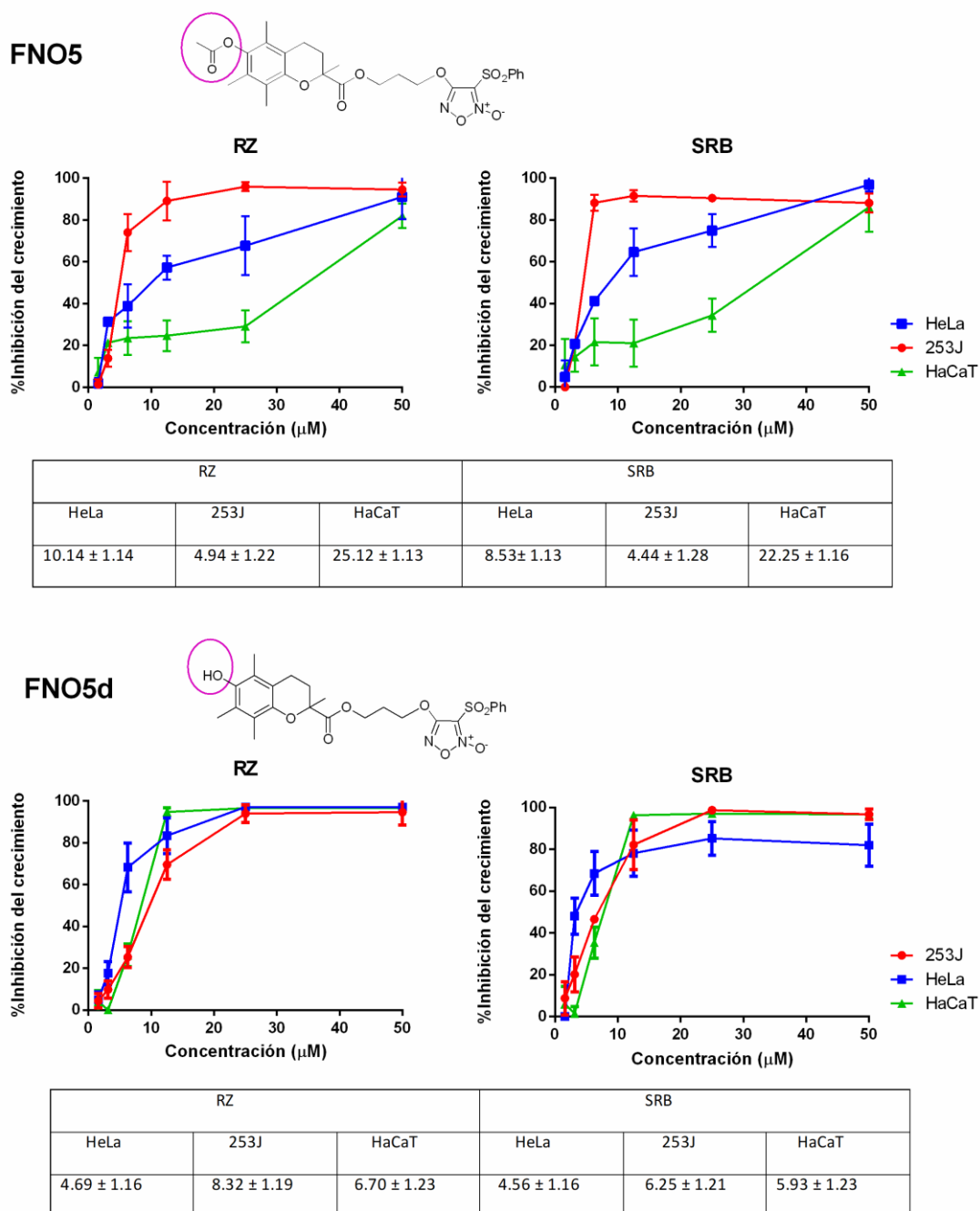


Figura 17. Estructuras de FNO5 y FNO5d, sus gráficos de dosis-respuesta (% inhibición del crecimiento vs concentración en μM) obtenidos mediante resazurina (izquierda) y sulforodamina B (derecha) y valores de IC_{50} en μM en las líneas celulares HeLa, 253J y HaCaT.

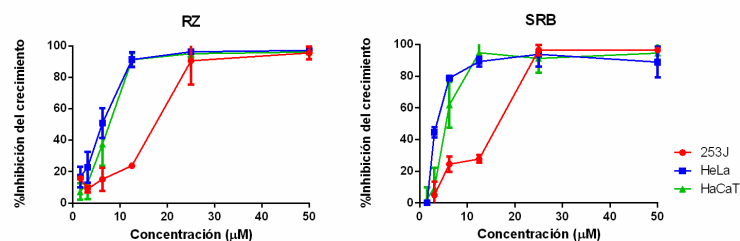
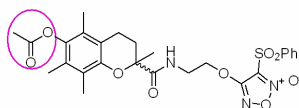
Respecto a los gráficos dosis-respuesta (Figura 17) del híbrido análogo de tocoferol-furoxano FNO5, se observa en 253J un importante porcentaje de inhibición de crecimiento (70-90%) a una concentración inferior a 12.5 μM , mientras que en HaCaT para tener un resultado de inhibición del crecimiento similar a este la concentración de

compuesto adicionada tendría que ser cercana a 50 μM . Para el caso de HeLa, la actividad anti-proliferativa observada es moderada. Esto demuestra que el compuesto FNO5, presenta actividad anti-proliferativa selectiva hacia la línea celular derivada de cáncer de vejiga 253J. Esto podría deberse a los altos niveles de NO cuantificados en esta línea celular.

Por el contrario el compuesto FNO5d, que presenta un grupo fenol libre, ejerce una acción anti-proliferativa en las tres líneas celulares estudiadas, sin selectividad hacia las tumorales. Esto se debe a que las curvas de dosis-respuesta en las obtenidas son similares entre sí (Figura 17) lo que resulta en valores de IC_{50} similares que se traducen en un IS cercano a 1. Esto indicaría que la presencia de un grupo fenol libre en la estructura química de FNO5d promueve la falta de selectividad del compuesto hacia las líneas celulares tumorales.

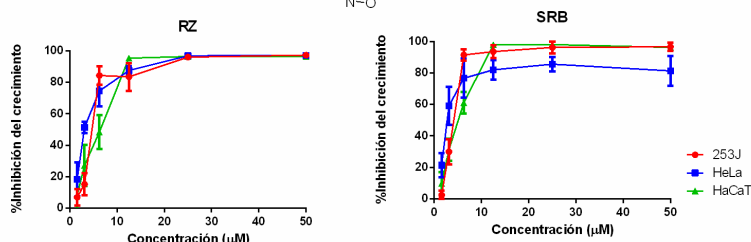
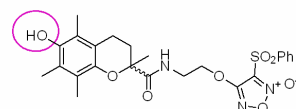
Los resultados de IC_{50} obtenidos (Figura 18) para el compuesto FNO6 el cual posee en su estructura al grupo fenol protegido, muestran que este presenta mayor acción anti-proliferativa hacia la línea celular HeLa respecto a la línea celular 253J. Lamentablemente, este compuesto afecta de forma similar a la línea celular normal HaCaT. Por otra parte, podemos observar que el compuesto FNO6d sustituido con un grupo fenol libre, posee una importante actividad anti-proliferativa hacia ambas líneas celulares tumorales posiblemente producto de su elevada capacidad liberadora de óxido nítrico. Sin embargo, no se observó selectividad hacia las líneas celulares cancerígenas ya que afecta también a la línea celular normal. Los índices de selectividad de estos dos compuestos respecto a la línea celular normal fueron similares al del cisplatino.

FNO 6



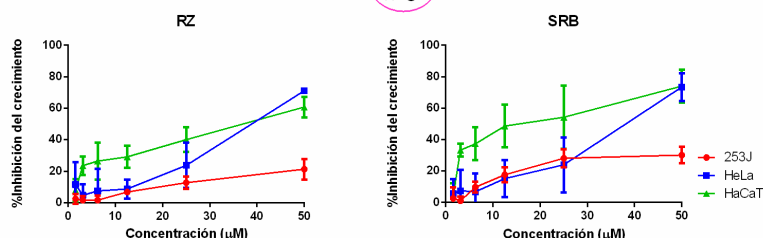
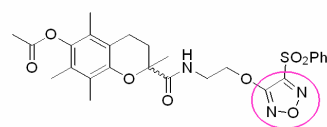
RZ			SRB		
HeLa	253J	HaCaT	HeLa	253J	HaCaT
4.75 ± 1.14	11.12 ± 1.25	5.68 ± 1.13	3.96 ± 1.19	10.38 ± 1.32	5.33 ± 1.16

FNO 6d



RZ			SRB		
HeLa	253J	HaCaT	HeLa	253J	HaCaT
3.01 ± 1.16	5.32 ± 1.16	4.83 ± 1.15	2.97 ± 1.16	3.37 ± 1.19	4.06 ± 1.14

FN6



RZ			SRB		
HeLa	253J	HaCaT	HeLa	253J	HaCaT
>50.00	>50.00	29.63 ± 1.08	40.87 ± 1.21	>50.00	15.22 ± 1.13

Figura 18. Estructuras de FNO6, FNO6d y FN6, graficos de dosis-respuesta (% inhibición del crecimiento vs concentración en µM) obtenidos mediante resazurina (izquierda) y sulfurodamina B (derecha) y valores de IC₅₀ en µM en las líneas celulares HeLa, 253J y HaCaT.

Por su parte, el compuesto deoxigenado FN6 no mostró actividad anti-proliferativa en células tumorales ya que se necesita una concentración superior a 50 μM para inhibir el 50% de la población celular, presentando además un efecto citotóxico preferentemente hacia la línea celular normal HaCaT como puede observarse en los gráficos.

De esta forma, los resultados obtenidos para el derivado de furazano FN6, análogo deoxigenado de FNO6, indican que la liberación del óxido nítrico por parte de FNO6 es la responsable de la actividad anti-proliferativa hacia las líneas celulares tumorales estudiadas.

De acuerdo a las anteriores observaciones, podemos concluir que la acción liberadora de óxido nítrico es necesaria para obtener la actividad anti-proliferativa de células tumorales, mientras que la presencia del grupo fenol protegido o desprotegido modifica las propiedades electrónicas de la molécula lo cual parece influir en la selectividad hacia una u otra línea celular cancerígena.

Finalmente, el quimioterápico cisplatino fue evaluado en las dos líneas celulares cancerígenas HeLa y 253J así como en la línea celular normal HaCaT (Figura 19).

Cisplatino

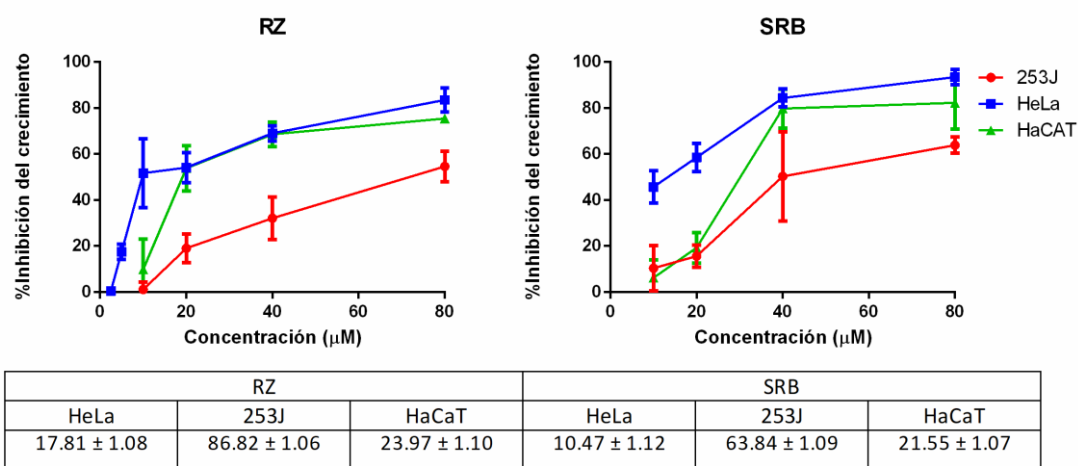


Figura 19. Gráficos de dosis-repuesta (% inhibición del crecimiento vs concentración en μM) obtenidos mediante resazurina (izquierda) y sulforodamina B (derecha) y valores de IC_{50} en μM en las líneas celulares HeLa, 253J y HaCaT.

De acuerdo a los resultados obtenidos, podemos observar que la proliferación de la línea celular HeLa se inhibe a una concentración de cisplatino relativamente baja. Sin embargo, la línea celular derivada de cáncer metastásico de vejiga 253J resistente al cisplatino, mostró un valor de IC_{50} muy elevado.

Si comparamos estos datos con los compuestos FNO y FNO5 vemos que concentraciones más de 10 veces inferiores son necesarias para obtener la IC_{50} de 253J. Estos compuestos presentaron además un IS muy significativo en esta línea celular, siendo para FNO (6,26) y FNO5 (5,01) respecto al cisplatino (0,34). Esto quiere decir que el compuesto FNO y FNO5 son 18 y 14 veces más selectivos que cisplatino hacia la línea celular 253J derivada de cáncer metastásico de vejiga.

De acuerdo a estos resultados, resulta de importancia considerar nuestros compuestos como líderes para el rediseño de nuevos agentes para el tratamiento del cáncer de vejiga.

3. Ensayo cometa

Basándonos en los resultados obtenidos de la actividad anti-proliferativa inducida por los compuestos, del índice de selectividad, y de la actividad liberadora de óxido nítrico, seleccionamos los compuestos FNO y FNO5 para evaluar su posible mecanismo de acción hacia las células cancerígenas. De esta manera, determinamos el daño al ADN mediante el ensayo cometa en condiciones alcalinas en las líneas celulares 253J y HeLa. Para ello las células fueron incubadas con los compuestos a una concentración de 50 μM durante 3 hs donde se observó previamente en el ensayo de Griess que se da el pico máximo de liberación de óxido nítrico. En este ensayo se incluyeron células tratadas con DMSO como control negativo y H_2O_2 como control positivo. Se realizaron dos preparados por condición y se contaron al menos 50 células en cada uno de ellos. Los momentos de cola de Olive que fueron cuantificados a través del programa Comet Imager se muestran a continuación (Figura 20).

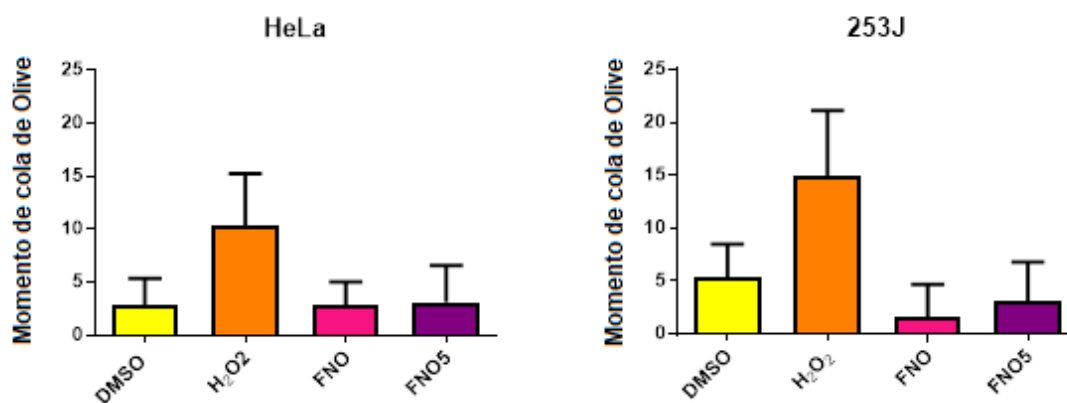


Figura 20. Resultados de los momentos de cola de Olive obtenidos en líneas celulares HeLa y 253J tratadas con DMSO (control negativo), H_2O_2 (control positivo) y los compuestos FNO y FNO5 a 50 μM durante 3 horas.

De acuerdo a los gráficos mostrados podemos observar que los compuestos en estudio, tienen un comportamiento similar al control negativo tratado con DMSO 1%, mientras que el control positivo H_2O_2 provoca un aumento en los niveles de ADN fragmentado. Estos resultados nos permiten concluir que la actividad anti-proliferativa ejercida por los compuestos FNO y FNO5 es dependiente de la liberación de óxido

nítrico, mientras que su mecanismo de acción se daría por un mecanismo independiente de la acción genotóxica.

Por último quisiera mencionar que los importantes resultados obtenidos en este trabajo de tesina, fueron parte de un artículo científico que fue aceptado para su publicación el día 3 de Noviembre en la revista Anti-Cancer Drugs [43].

V. Conclusiones

Se evaluaron exitosamente siete compuestos como potenciales agentes para el tratamiento del cáncer de cuello de útero y de vejiga, a partir de la puesta a punto de un ensayo en tándem. Este mostro ser un método sumamente útil para la evaluación de la liberación de NO y actividad anti-proliferativa de compuestos de forma consecutiva, utilizando la misma muestra, evitando variabilidad entre ensayos independientes y a un menor tiempo y costo.

Determinamos por el ensayo de Griess que en ambas líneas celulares cancerígenas el pico de liberación de NO ocurre a las 3hs de incubación de los compuestos, destacándose en HeLa el híbrido análogo de tocoferol-furoxano FNO6d y en 253J los furoxanos FNO y FNO1.

Los ensayos para determinar la actividad anti-proliferativa mediante resazurina y sulforodamina B mostraron resultados similares mostrando una excelente correlación entre ambos métodos. En este estudio observamos que FNO y FNO5 mostraron ser selectivos hacia las líneas celulares cancerígenas 253J y HeLa, con baja toxicidad hacia la línea normal HaCaT, abriendo una perspectiva hacia el diseño de nuevos compuestos para la terapia anti-cáncer.

Finalmente, concluimos que la actividad anti-proliferativa es dependiente de la liberación de NO por parte de los compuestos y que los mismos actuarían por un mecanismo de acción independiente del daño genotóxico.

VI. Referencias

[1] a) <http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer> (consultado Mayo 2018). b) <https://www.cancer.org/es/cancer/aspectos-basicos-sobre-el-cancer/que-es-el-cancer.html> (consultado Noviembre 2018). c) Alberghina, L; Chiaradonna, F; Vanoni, M. “Systems Biology and the Molecular Circuits of Cancer”. *ChemBioChem*. 2004; 5:1322–1333. d) <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/naturaleza/que-es> (consultado Noviembre 2018).

[2] <http://gco.iarc.fr/today/explore> (consultado Noviembre 2018).

[3] a) <https://www.cancer.org/es/cancer/cancer-de-cuello-uterino/acerca/que-es-cancer-de-cuello-uterino.html> (consultado Junio 2018). b) Control integral del cáncer cervicouterino: Guía de prácticas esenciales. Segunda edición. (2015) 420.

[4] <http://cancercervicouterino.com.mx/anatomia-basica-del-cervix/> (consultado noviembre 2018).

[5] a) <http://gco.iarc.fr/today/explore> (consultado Noviembre 2018) b) Control integral del cáncer cervicouterino: Guía de prácticas esenciales. Segunda edición. (2015) Pg 29.

[6] a) <http://gco.iarc.fr/today/explore> (consultado Noviembre 2018).

[7]

https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=5420&Itemid=3637&lang=es (consultado Junio 2018)

[8] a) Babjuk, M; Oosterlinck, W; Sylvester, R; Kaasinen, E; Böhle, A; Palou-Redorta J; Rouprêt, M. “EAU guidelines on non-muscle-invasive urothelial carcinoma of the bladder, the 2011 update”. *Eur Urol*. 2011; 59:997-1008. b) <https://www.cancer.org/es/cancer/cancer-de-vejiga/causas-riesgos-prevencion/que-lo-causa.html> (consultado Julio 2018). c) <https://www.cancer.org/es/cancer/cancer-de-vejiga/causas-riesgos-prevencion/factores-de-riesgo.html> (consultado Julio 2018). d) <https://www.aecc.es/es/todo-sobre-cancer/tipos-cancer/cancer-vejiga/factores-riesgo-cancer-vejiga> (consultado Julio 2018).

[9] a) <https://www.cancer.org/es/cancer/cancer-de-vejiga/acerca/que-es-cancer-de-vejiga.html> (consultado Julio 2018). b) <https://www.aecc.es/es/todo-sobre-cancer/tipos-cancer/cancer-vejiga/que-es-cancer-vejiga> (consultado Julio 2018).

[10] a) <https://www.cancer.org/es/cancer/cancer-de-vejiga/acerca/que-es-cancer-de-vejiga.html> (consultado Julio 2018).

b) <https://www.cancer.gov/espanol/tipos/vejiga/pro/tratamiento-vejiga-pdq> (consultado Julio 2018). [11] <https://www.cancer.org/es/cancer/cancer-de-vejiga/acerca/que-es-cancer-de-vejiga.html> (consultado Julio 2018).

[12] a) <https://www.cancer.org/es/cancer/cancer-de-vejiga/acerca/que-es-cancer-de-vejiga.html> (consultado Julio 2018).

b) <https://www.cancer.gov/espanol/tipos/vejiga/pro/tratamiento-vejiga-pdq> (consultado Julio 2018).

[13] <http://gco.iarc.fr/today/explore> (consultado Noviembre 2018)

[14] a) <https://www.cancer.org/es/cancer/cancer-de-vejiga/tratamiento.html> (consultado Julio 2018). b) <https://www.cancer.org/es/cancer/cancer-de-cuello-uterino/tratamiento.html> (consultado Julio 2018).

c) <https://www.cancer.org/es/cancer/cancer-de-vejiga/tratamiento/terapia-intravesical.html> (consultado Julio 2018).

d) <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/tratamiento/tipos/terapia-dirigida/hoja-informativa-terapias-dirigidas#q8> (consultado Noviembre 2018).

e) <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/tratamiento/tipos/quimioterapia> (consultado Julio 2018). f) <https://www.cancer.org/es/tratamiento/tratamientos-y-efectos-secundarios/tipos-de-tratamiento/quimioterapia/que-es-la-quimioterapia-y-como-ayuda/preguntas-sobre-quimioterapia.html> (consultado Julio 2018).

[15] a) Pierre Mitchel Aristil Chéry. “Manual de Farmacología Básica y Clínica”. 5ª, cap.35. Edición McGraw-Hill Education. Pg 318. 2010. b) van Leeuwen, I.M; Rao, B; Sachweh, M.C; Lain, S. “An evaluation of small-molecule p53 activators as chemoprotectants ameliorating adverse effects of anticancer drugs in normal cells”. Cell Cycle. 2012; 11: 1851–1861. c) van Leeuwen, I.M. “Cyclotherapy: opening a

therapeutic window in cancer treatment”. *Oncotarget*. 2012; 6: 596–600. d) <https://www.msssi.gob.es/ciudadanos/saludAmbLaboral/saludLaboral/vigiTrabajadores/protocolos.htm> (consultado Julio 2018). e) <https://www.cancer.org/es/tratamiento/tratamientos-y-efectos-secundarios/tipos-de-tratamiento/quimioterapia/como-funcionan-los-medicamentos-de-quimioterapia.html> (consultado Julio 2018).

[16]a)

<https://www.msssi.gob.es/ciudadanos/saludAmbLaboral/saludLaboral/vigiTrabajadores/protocolos.htm> (consultado Julio 2018). b) <https://www.cancer.org/es/tratamiento/tratamientos-y-efectos-secundarios/tipos-de-tratamiento/quimioterapia/como-funcionan-los-medicamentos-de-quimioterapia.html> (consultado Julio 2018).

[17]

a) <https://www.cancer.org/es/cancer/cancer-de-cuello-uterino/tratamiento/quimioterapia.html> (consultado Julio 2018). b) <https://www.cancer.org/es/cancer/cancer-de-vejiga/tratamiento/quimioterapia.html> (consultado Julio 2018).

[18] a) van Leeuwen, I.M; Rao, B; Sachweh, M.C; Lain, S. “An evaluation of small-molecule p53 activators as chemoprotectants ameliorating adverse effects of anticancer drugs in normal cells”. *Cell Cycle*. 2012; 11: 1851–1861. b) van Leeuwen, I.M. “Cyclotherapy: opening a therapeutic window in cancer treatment”. *Oncotarget*. 2012; 6: 596–600. c) <https://www.aecc.es/es/todo-sobre-cancer/tratamientos/quimioterapia/efectos-secundarios-quimioterapia> (consultado Julio 2018).

[19] a) Álvarez, C; Castro Nessim, E; Virginillo, JM; Bruno, G; González, C; Vallejos, J; Dieguez, A. “Actualización de la estadificación de cáncer de cuello uterino”. *RAR*. 2012; 76:169-171. b) Guerrero-Gomez, O.A; Guerrero-Florez, M. “MicroRNAs associated with Cervical Cancer and its precursor lesions: A systematic review”. *Univ. Salud*. 2016; 18:345-363. b) Bellmunt, J; Petrylak, D.P. “New therapeutic challenges in advanced bladder cancer”. *Semin Oncol*. 2012; 39:598-607. c) Sonpavde, G; Jones, B.S; Bellmunt,

J; Choueiri, T.K; Sternberg, C.N. “Future directions and targeted therapies in bladder cancer”. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2015; 29:361-376.

[20] a) Choudhari, S.K.; Chaudhary, M.; Bagde, S.; Gadbail, A.R.; Joshi, V. “Nitric oxide and cancer: a review”. *World J Surg Oncol.* 2013; 11:118 (revisar esta ref). b) Huang, Z; Fu, J; Zhang, Y. “Nitric oxide donor-based cancer therapy: advances and prospects”. *J Med Chem.* 2017; 60:7617-7635. c) Borretto, E.; Lazzarato, L.; Spallotta, F.; Cencioni, C.; D’Alessandra, Y.; Gaetano, C.; Fruttero, R.; Gasco, A. “Synthesis and Biological Evaluation of the First Example of NO-Donor Histone Deacetylase Inhibitor”. *ACS Med Chem Lett.* 2013; 4:994–999. d) Illi, B; Colussi, C; Grasselli, A; Farsetti, A; Capogrossi, M.C; Gaetano, C. “NO sparks off chromatin: tales of a multifaceted epigenetic regulator”. *Pharmacol Ther.* 2009; 123:344-52. e) Sudhesh, P.; Tamilarasan, K.; Arumugam, P.; Berchmans, S. “Nitric oxide releasing photoresponsive nanohybrids as excellent therapeutic agent for cervical cancer cell lines”. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2013; 5:8263-6.

[21]a) Huang, Z; Fu, J; Zhang, Y. “Nitric oxide donor-based cancer therapy: advances and prospects”. *J Med Chem.* 2017; 60:7617-7635. b) Choudhari, S.K.; Chaudhary, M.; Bagde, S.; Gadbail, A.R.; Joshi, V. “Nitric oxide and cancer: a review”. *World J Surg Oncol.* 2013; 11:118 (revisar esta ref). c) Wink, D.A; Ridnour, L.A; Hussain, S.P; Harris, C.C. “The reemergence of nitric oxide and cancer”. *Nitric Oxide.* 2008; 19:65–67.

[22] Huang, Z; Fu, J; Zhang, Y. “Nitric oxide donor-based cancer therapy: advances and prospects”. *J Med Chem.* 2017; 60:7617-7635

[23] a) Illi, B; Colussi, C; Grasselli, A; Farsetti, A; Capogrossi, M.C; Gaetano, C. “NO sparks off chromatin: tales of a multifaceted epigenetic regulator”. *Pharmacol Ther.* 2009; 123:344-52.. b) Borretto, E.; Lazzarato, L.; Spallotta, F.; Cencioni, C.; D’Alessandra, Y.; Gaetano, C.; Fruttero, R.; Gasco, A. “Synthesis and Biological Evaluation of the First Example of NO-Donor Histone Deacetylase Inhibitor”. *ACS Med Chem Lett.* 2013; 4:994–999. c) Huang, Z; Fu, J; Zhang, Y. “Nitric oxide donor-based cancer therapy: advances and prospects”. *J Med Chem.* 2017; 60:7617-7635 d) Cook, T; Wang, Z; Alber, S; Liu, K; Watkins, S.C; Vodovotz, Y; Billiar, T.R; Blumberg, D. “Nitric oxide and ionizing radiation synergistically promote apoptosis and growth inhibition of

cancer by activating p53". *Cancer Res.* 2004; 64:8015–21. e) Shafran, Y; Zurgil, N; Ravid-Hermesh, O; Sobolev, M; Afrimzon, E; Hakuk, Y; Shainberg, A; Deutsch, M. "Nitric oxide is cytoprotective to breast cancer spheroids vulnerable to estrogen-induced apoptosis". *Oncotarget.* 2017; 8:108890–108911. f) Bonavida, B.; Baritaki, S. "Dual role of NO donors in the reversal of tumor cell resistance and EMT: Downregulation of the NF- κ B/Snail/YY1/RKIP circuitry". *Nitric Oxide.* 2011; 24:1-7. g) Cui, X.; Shen, D.; Kong, C.; Zhang, Z.; Zeng, Y.; Lin, X.; Liu, X. "NF- κ B suppresses apoptosis and promotes bladder cancer cell proliferation by upregulating survivin expression in vitro and in vivo". *Sci Rep.* 2017; 7:40723. h) Colussi, C.; Mozzetta, C.; Gurtner, A. et al. "HDAC2 blockade by nitric oxide and histone deacetylase inhibitors reveals a common target in Duchenne muscular dystrophy treatment". *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008; 105:19183-19187. i) Kong, Y.; Grimaldi, M.; Curtin, E. et.al. "Neural crest development and craniofacial morphogenesis is coordinated by nitric oxide and histone acetylation". *Chem Biol.* 2014; 21:488-501. j) Illi, B.; DelloRusso, C.; Colussi, C. et al. C. "Nitric oxide modulates chromatin folding in human endothelial cells via protein phosphatase 2A activation and class II histone deacetylases nuclear shuttling". *Circ Res.* 2008; 102: 51-8. k) Illi, B.; Colussi, C.; Grasselli, A; Farsetti, A; Capogrossi, M.C; Gaetano, C. "NO sparks off chromatin: tales of a multifaceted epigenetic regulator". *Pharmacol Ther.* 2009; 123:344-52. l) Vasudevan, D; Hickok, J.R; Bovee, R.C; Pham, V; Mantell, L.L; Bahroos, N; Kanabar, P; Cao, X.J; Maienschein-Cline, M; Garcia, B.A; Thomas D.D. "Nitric Oxide Regulates Gene Expression in Cancers by Controlling Histone Posttranslational Modifications". *Cancer Res.* 2015; 75:5299-308. m) Seabra, A.B; Durán, N. "Nitric oxide donors for prostate and bladder cancers: Current state and challenges". *Eur J Pharmacol.* 2018; 826:158-168. n) Sumbayev, V.V; Budde, A.; Zhou, J.; Brune B. "HIF-1 alpha protein as a target for S-nitrosation". *FEBS Lett.* 2003; 535:106–112.

[24] a) Cerecetto, H; Porcal, W. "Pharmacological properties of furoxans and benzofuroxans: recent developments". *Mini Rev Med Chem.* 2005; 5:57-71.

[25] Gagic, Z; Nikolic, K; Ivkovic, B; Filipic, S; Agbaba, D.J. "QSAR studies and design of new analogs of vitamin E with enhanced antiproliferative activity on MCF-7 breast cancer cells". *Taiwan Inst. Chem. E.* 2016; 59:33-44.

[26] a) López, G.V; Batthyány, C; Blanco, F; Botti, H; Trostchansky, A; Migliaro, E; Radi, R; González, M; Cerecetto, H; Rubbo, H. "Design, synthesis, and biological characterization of potential antiatherogenic nitric oxide releasing tocopherol analogs". *Bioorg. Med. Chem.* 2005; 13:5787-5796. b) López, G.V; Blanco, F; Hernández, P; Ferreira, A; Piro, O; Batthyány, C; González, M; Rubbo, H; Cerecetto, H. "Second generation of alpha-tocopherol analogs-nitric oxide donors: Synthesis, physicochemical, and biological characterization". *Bioorg. Med. Chem.* 2007; 15:6262-6272. c) Cabrera, M.; López, G.V.; Gómez, L.E.; Breijo, M.; Pintos, C.; Botti, H.; Raymondo, S.; Vettorazzi, A.; López de Ceráin, A.; Monge, A.; Rubbo, H.; González, M.; Cerecetto, H. "Genetic toxicology and preliminary in vivo studies of nitric oxide donor tocopherol analogs as potential new class of antiatherogenic agents". *Drug Chem. Toxicol.* 2011; 34:285-93.

[27] Ingold, M; Dapuetto, R; Victoria, S; Galliusi, G; Batthyany, C; Bollati-Fogolín, M; Tejedor, D; García-Tellado, F; Padron, J.M; Porcal, W; Lopez, G.V. "A green multicomponent synthesis of tocopherol analogues with antiproliferative activities". *Eur J Med Chem.* 2018; 143:1888-1902.

[28] a) Huang, Z; Fu, J; Zhang, Y. "Nitric oxide donor-based cancer therapy: advances and prospects". *J Med Chem.* 2017; 60:7617-7635. b) Wink, D.A; Ridnour, L.A; Hussain, S.P; Harris, C.C. "The reemergence of nitric oxide and cancer". *Nitric Oxide.* 2008; 19:65–67. c) Seabra, A.B; Durán, N. "Nitric oxide donors for prostate and bladder cancers: Current state and challenges". *Eur J Pharmacol.* 2018; 826:158-168.

[29] a) Vahora, H; Khan, M.A; Alalami, U; Hussain, A. "The Potential Role of Nitric Oxide in Halting Cancer Progression Through Chemoprevention". *J Cancer Prev.* 2016; 21:1–12. b) Park, I.C; Woo, S.H; Park, M.J; Lee, H.C; Lee, S.J; Hong, Y.J; Lee, S.H; Hong, S.I; Rhee, C.H. "Ionizing radiation and nitric oxide donor sensitize Fas-induced apoptosis via up-regulation of Fas in human cervical cancer cells". *Oncol Rep.* 2003 10(3) 629-33. c) Huerta, S.; Chilka, S.; Bonavida, B. "Nitric oxide donors: novel cancer therapeutics (review)". *Int J Oncol.* 2008; 33:909-27. d) Sogawa, K; Numayama-Tsuruta, K; Ema, M; Abe, M; Abe, H; Fujii-Kuriyama, Y. "Inhibition of hypoxia-inducible factor 1 activity by nitric oxide donors in hypoxia". *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998; 95:7368–7373. e) Wei,

X.M; Wang, Q; Gao, S.J; Sui, L. “[Relationship between nitric oxide in cervical microenvironment and different HPV types and effect on cervical cancer cells]”. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi*. 2011; 46:260-5.

[30] a) Seabra, A.B; Durán, N. “Nitric oxide donors for prostate and bladder cancers: Current state and challenges”. *Eur J Pharmacol*. 2018; 826:158-168. b) Cui, X; Shen, D; Kong, C; Zhang, Z; Zeng, Y; Lin, X; Liu, X. “NF- κ B suppresses apoptosis and promotes bladder cancer cell proliferation by upregulating survivin expression in vitro and in vivo”. *Sci Rep*. 2017; 7:40723.

[31] Bryan, N.S; Grisham, M.B. “Methods to detect nitric oxide and its metabolites in biological samples”. *Free Radic Biol Med*. 2007; 43:645–57.

[32] a) Bryan, N.S; Grisham, M.B. “Methods to detect nitric oxide and its metabolites in biological samples”. *Free Radic Biol Med*. 2007; 43:645–57. b) Bellavi, L; Kim-Shapiro, D.B; King, S.B. “Detecting and monitoring NO, SNO and nitrite in vivo”. *Future Sci OA*. 2015; 1: FSO36. c) Rodriguez, J; Specian, V; Maloney, R; Jourd'heuil, D; Feelisch, M. “Performance of diamino fluorophores for the localization of sources and targets of nitric oxide”. *Free Radic Biol Med*. 2005; 38:356-68. d) Hausladen, A; Rafikov, R; Angelo, M; Singel, D.J; Nudler, E; Stamler, J.S. “Assessment of nitric oxide signals by triiodide chemiluminescence”. *PNAS*. 2007; 104:2157–2162.

[33] a) Tsikas, D. “Methods of quantitative analysis of the nitric oxide metabolites nitrite and nitrate in human biological fluids”. *Free Radic Res*. 2005; 39:797-815. b) Tsikas D. “Analysis of nitrite and nitrate in biological fluids by assays based on the Griess reaction: appraisal of the Griess reaction in the L-arginine/nitric oxide area of research”. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2007; 851:51-70. c) Bryan, N.S; Grisham, M.B. “Methods to detect nitric oxide and its metabolites in biological samples”. *Free Radic Biol Med*. 2007; 43:645–657. d) Wen, Q; Paik, DC. “Using the Griess colorimetric nitrite assay for measuring aliphatic β -nitroalcohols”. *Exp Eye Res*. 2012; 98:52-57. e) Ivanov, VM. “The 125th Anniversary of the Griess Reagent”. *Journal of Analytical Chemistry*. 2004; 59:1002–1005.

[34] a) Bryan, N.S; Grisham, M.B. “Methods to detect nitric oxide and its metabolites in biological samples”. *Free Radic Biol Med.* 2007; 43:645–657.

[35] a) Tsikas, D. “Methods of quantitative analysis of the nitric oxide metabolites nitrite and nitrate in human biological fluids”. *Free Radic Res.* 2005; 39:797-815. b) Tsikas D. “Analysis of nitrite and nitrate in biological fluids by assays based on the Griess reaction: appraisal of the Griess reaction in the L-arginine/nitric oxide area of research”. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2007; 851:51-70 c) Bryan, N.S; Grisham, M.B. “Methods to detect nitric oxide and its metabolites in biological samples”. *Free Radic Biol Med.* 2007; 43:645–657. d) Wen, Q; Paik, DC. “Using the Griess colorimetric nitrite assay for measuring aliphatic β -nitroalcohols”. *Exp Eye Res.* 2012; 98:52-57. e) Ivanov, VM. “The 125th Anniversary of the Griess Reagent”. *Journal of Analytical Chemistry.* 2004; 59:1002–1005.

[36] Silva, F.S; Starostina, I.G; Ivanova, V.V; Rizvanov, A.A; Oliveira, P.J; Pereira, S.P. “Determination of metabolic viability and cell mass using a tandem resazurin/sulforhodamine B assay. In assessment of cell toxicity!. *Curr Protoc Toxicol.* 2016; 68:2. 24.1-2.24.15.

[37]a) Csepregi, R; Lemli, B; Kunsági-Máté, S; Szente, L; Kőszegi, T; Németi, B; Poór, M. “Complex Formation of Resorufin and Resazurin with B-Cyclodextrins: Can Cyclodextrins Interfere with a Resazurin Cell Viability Assay?”. *Molecules.* 2018; 23:382. b) <https://www.ozbiosciences.com/viability-stress/91-ozblue-cell-viability-kit.html> (consultado Noviembre 2018).

[38] Silva, F.S; Starostina, I.G; Ivanova, V.V; Rizvanov, A.A; Oliveira, P.J; Pereira, S.P. “Determination of metabolic viability and cell mass using a tandem resazurin/sulforhodamine B assay. In assessment of cell toxicity!. *Curr Protoc Toxicol.* 2016; 68:2. 24.1-2.24.15.

[39] https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Sulforhodamine_B (Consultado Noviembre 2018).

[40] Silva, F.S; Starostina, I.G; Ivanova, V.V; Rizvanov, A.A; Oliveira, P.J; Pereira, S.P. “Determination of metabolic viability and cell mass using a tandem resazurin/

sulforhodamine B assay. In assessment of cell toxicity!. *Curr Protoc Toxicol.* 2016; 68:2. 24.1-2.24.15.

[41] a) Silva, F.S; Starostina, I.G; Ivanova, V.V; Rizvanov, A.A; Oliveira, P.J; Pereira, S.P. “Determination of metabolic viability and cell mass using a tandem resazurin/sulforhodamine B assay. In assessment of cell toxicity!. *Curr Protoc Toxicol.* 2016; 68:2. 24.1-2.24.15. b) Bopp, S.K; Lettieri T. “Comparison of four different colorimetric and fluorometric cytotoxicity assays in a zebrafish liver cell line”. *BMC Pharmacol.* 2008; 8:8 c) Voytik-Harbin, SL; Brightman, AO; Waisner, B; Lamar, CH; Badylak, SF. “Application and evaluation of the alamarBlue assay for cell growth and survival of fibroblasts”. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 1998; 34:239-46.

[42] Silva, F.S; Starostina, I.G; Ivanova, V.V; Rizvanov, A.A; Oliveira, P.J; Pereira, S.P. “Determination of metabolic viability and cell mass using a tandem resazurin/sulforhodamine B assay. In assessment of cell toxicity!. *Curr Protoc Toxicol.* 2016; 68:2. 24.1-2.24.15.

[43] Pérez, F; Varela, M; Canclini, L; Acosta, S; Martínez-López, W; López G.V; Hernández, P. Furoxans and tocopherol analogs–furoxan hybrids as anticancer agents. Artículo acetado para su publicación el 3 de Noviembre en *Anti-Cancer Drugs*.