



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY



FACULTAD DE
CIENCIAS
UDELAR | fcien.edu.uy



Centro de
Investigaciones Nucleares
Facultad de Ciencias



Tesina de grado – Licenciatura en Bioquímica

**Estudio de la actividad
antitumoral en modelo de
tumor sólido de cáncer de
mama murino del pro-fármaco
selectivo en hipoxia N^5 , N^{10} -
dióxido de 2-amino-7(8)-
fluorofenazina**

Bach. Belén Dávila

Tutora: Dra. Mercedes González

Co-tutora: Msc. Nicole Lecot

Diciembre 2019

“No hay que temer a nada en la vida, solo tratar de comprender”

Marie Curie 1867-1934



Agradecimientos

Me gustaría agradecer a todas esas personas que de una u otra forma me acompañaron en esta etapa tan importante para mí.

A Mercedes, Nicole y Hugo gracias por siempre enseñarme, aconsejarme y darme aliento a seguir adelante, grandes tutores y mejores personas aún. Gracias también por abrirme las puertas de laboratorio y permitirme trabajar con ustedes, fue un placer.

A todo el Grupo de Química Medicinal y del CIN por las horas de laboratorio, almuerzos y más compartidas.

A mis amigas de la carrera que tantas horas de estudio pasamos juntas.

A Marcelo por toda la ayuda y aprendizaje con los animales de laboratorio y la buena onda a la hora de trabajar.

A José Pacheco por el análisis de las muestras histológicas.

A Cristina Pintos por los análisis clínicos.

A María José Arezo por la preparación de los cortes para histología.

Por último, pero para nada menos importante, a mi familia. A mis padres por su apoyo incondicional y mis hermanos por estar siempre conmigo y no dejar que me rinda nunca.

A ANII y CSIC por el apoyo económico

A todos muchísimas gracias.

Índice

RESUMEN.....	VII
ABREVIATURAS.....	IX
ÍNDICE DE IMÁGENES.....	X
1. Introducción	
1.1 Cáncer.....	2
1.2 Estadísticas.....	2
1.3 Generalidades.....	3
1.4 Tratamientos.....	5
1.5 Hipoxia tumoral.....	6
1.5.1 Angiogénesis.....	8
1.5.2 Quimio y radio-resistencia en condiciones de hipoxia.....	9
1.6 Pro-fármacos bio-reducibles.....	10
1.7 Agentes intercalantes del ADN.....	13
1.8 Modelo experimental para el estudio del cáncer de mama.....	15
2. Antecedentes	
2.1 N-óxido de fenazina.....	19
3. Objetivos	21
4. Materiales y métodos	
4.1 Escalado de la síntesis de FNZ y caracterización fisicoquímica.....	23
4.2 Cultivo de la línea celular.....	24
4.3 Vehiculización de FNZ.....	24
4.4 Estudios <i>In vivo</i>	24
4.4.1 Caracterización del modelo tumoral.....	25
4.4.2 Estudio anti-tumoral.....	26
4.4.3 Análisis clínicos.....	27
4.5 Estudios <i>post-mortem</i>	27
4.5.1 Obtención de muestras para análisis patológico.....	27
4.5.2 Preparación de cortes histológicos.....	28

5. Resultados y discusión	
5.1 Escalado de FNZ.....	32
5.2 Vehiculización de FNZ y ensayo de toxicidad aguda en modelo murino.....	33
5.3 Estudio anti-tumoral In vivo.....	34
5.3.1 Caracterización del modelo tumoral.....	34
5.3.2 Estudio anti-tumoral.....	35
5.3.3 Análisis clínicos.....	39
5.4 Estudios <i>post-mortem</i>	41
5.4.1 Necropsias.....	41
5.4.2 Anatomía patológica.....	42
6. Conclusiones	44
7. Perspectivas	45
8. Bibliografía	46

Resumen

El cáncer es una enfermedad que se caracteriza por su rápido avance y diseminación, generando complicaciones de diferente índole en el normal funcionamiento del cuerpo, que en algunos casos ocasiona la muerte del paciente.

En particular, el cáncer de mama es caracterizado como un carcinoma invasivo, más específicamente llamado adenocarcinoma. Se inicia en las células glandulares (secretoras), pasando por diferentes etapas en su progresión resultando en un tumor sólido.

Los principales tratamientos que se usan para tratar pacientes con cáncer son: cirugía, radiación, fármaco-terapia y cuidados paliativos; dependiendo cada uno de ellos de varios factores, los cuales serán indicados por el médico tratante.

Es así que nuestro grupo, viene analizando ciertas particularidades de los tumores sólidos, para diseñar candidatos a nuevos fármacos. Entre ellas, menor oxigenación que los tejidos normales, con la concomitante generación de zonas necróticas (cuando hay una hipoxia prolongada) y lo más importante la resistencia a radioterapias y quimioterapias, aumentando así la expansión de las células cancerosas, generándose lo que se conoce como metástasis. Por lo que hemos planteado como solución a este tipo de tumores, el uso de fármacos tóxicos en estas condiciones basados en su bio-reducción diferencial.

Particularmente, se plantea la síntesis de un derivado de N,N' -dióxido de fenazina que presenta, en condiciones de hipoxia, citotoxicidad selectiva frente a condiciones de normoxia. Así, se profundizó en el estudio de N,N' -dióxido de 2-amino-7(8)-fluorofenazina, FNZ, en cuanto a su actividad *in vivo*.

En primer lugar se realizó la síntesis de FNZ a escala de gramo, poniendo énfasis en pasos extra de purificación que mejoren el rendimiento global del proceso.

Dada la baja solubilidad en disolventes acuosos de FNZ, se la vehiculizó en una mezcla de suero fisiológico: Tween 80, en relación 4:1 (% v/v), logrando una dispersión mejorada en términos de solubilidad.

Se realizó el estudio de su actividad *in vivo* en cuanto a su capacidad anti-tumoral en modelo murino portador de tumor de mama metastásico, generado por inoculación de la línea celular 4T1. El modelo tumoral fue previamente caracterizado para conocer la cinética de crecimiento del tumor.

En un protocolo farmacológico se demostró *in vivo* la capacidad de FNZ para ralentizar el crecimiento tumoral. Se realizaron necropsias, análisis de anatomía patológica y clínicos *post-mortem*, los cuales confirmaron el actuar de FNZ sobre este tipo de tumor, además de evaluar los efectos citotóxicos del agente sobre el animal.

Abreviaturas

Bfx	5-fluorobenzofuroxano
DMF	<i>N, N</i> - dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
Et₃N	Trietilamina
Et₂O	Dietiléter
EtOAc	Acetato de etilo
FNZ	<i>N</i> ⁵ , <i>N</i> ¹⁰ -dióxido de 2-amino-7(8)-fluorofenazina
MeOH	Metanol
OECD	Organización de Cooperación y Desarrollo Económico
¹H RMN	Resonancia Magnética Nuclear de protón.
RPM	Revoluciones por minuto
RPMI	Rosewell Parck Memorial Institute (medio de cultivo)
SFB	Suero Fetal Bovino
SF:T	Mezcla Suero Fisiológico : Tween 80
TMS	Tetrametilsilano

Índice de imágenes

Figura 1. Gráfico circular de mortalidad en Uruguay en el año 2016. (Informe META 2016)	2
Figura 2. Etapas de la carcinogénesis (Pan, M. y col 2011)	5
Figura 3. Zonas de tumor hipóxico (Gurusamy, D. y col 2017)	6
Figura 4. Representación de la disminución de pO ₂ con el progreso de la masa tumoral (Boticario, C. y col 2010)	7
Figura 5. Comparación de vasos sanguíneos normales y en tumor (Brown, J. 2000)	8
Figura 6. Moléculas referentes de las diferentes familias de pro-fármacos bio-reducibles (Philips, R 1998 – Jaffar, M. y col 1999)	11
Figura 7. Mecanismo de acción de TPZ (Cerecetto, H. 2006)	13
Figura 8. Agentes intercalantes en uso y desarrollo para el tratamiento de cáncer (Ibrahim, M. y col 2018)	15
Figura 9. Fotografía del modelo animal utilizado (Tomada en LEA, CIN)	16
Figura 10. Bio-reducción de <i>N</i> -óxidos aromáticos (Cerecetto, H. y col 2006)	26
Figura 11. Diseño de potencial pro-fármaco utilizado en este trabajo (Lavaggi, ML. 2009)	27
Figura 12. Estructura de <i>N</i> ⁵ , <i>N</i> ¹⁰ – dióxido de 2-amino-7(8) fluorofenazina	31
Figura 13. Imagen de microscopía óptica de la línea celular 4T1 (ATCC)	34
Figura 14. Ratón hembra, cepa: Balb/c siendo inoculado con la línea celular inductora de cáncer de mama	36
Figura 15. Esquema representativo de tinción típica de Hematoxilina- Eosina	40
Figura 16. Procedimiento sintético para la obtención de FNZ	44
Figura 17. Espectro de ¹ H RMN de FNZ	45
Figura 18. Caracterización del modelo tumoral	47
Figura 19. Evolución del tamaño tumoral de los dos grupos de animales: tratados vs control	49
Figura 20. Curva de supervivencia	51
Figura 21. Imagen comparativa de los tamaños tumorales de los dos grupos de animales	54

Figura 22. Imagen comparativa de los tamaños de los bazos de los dos grupos de animales_____54

Figura 23. Corte histológico de tumor sólido de cáncer de mama murino_____55

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Cáncer

El término **cáncer**, según la Organización Mundial de la Salud, se usa para describir un grupo de enfermedades que pueden afectar cualquier parte del cuerpo y cuya característica principal es la rápida multiplicación de células anormales. ¹ Dicha afectación no sigue un único patrón, y presenta diferentes orígenes dependiendo de diversos factores epidemiológicos y genéticos. Cabe destacar que se conocen hoy día más de 200 tipos de cáncer en los que se está explorando su erradicación con diversas estrategias. ²

1.2. Estadísticas

Mundialmente científicos han volcado sus esfuerzos en el estudio del cáncer dado que es una de las principales causas de muerte a nivel mundial.

En lo que a estadística refiere, poco más de 14 millones de nuevos casos aparecieron en el año 2012, siendo el cáncer de pulmón el más incidente en hombres y el de mamá en mujeres a nivel mundial. Asimismo, se han reportado aproximadamente 8 millones de muertes por esta enfermedad y más de la mitad de todas ellas en zonas como pulmón, estómago, hígado, colorrectal y mama. ³

Nuestro país presenta los mayores índices de incidencia y mortalidad en América Latina. Entre los años 2010 y 2014, el Registro Nacional del Cáncer detectó poco más de 79.000 casos de tumores malignos, habiendo un promedio de aproximadamente 15.000 nuevos casos por año. En cuanto a mortalidad, se estima que más de un cuarto de las muertes en Uruguay son a causa de cáncer, (**Figura 1**) y se han registrado casi 40.000 muertes. ⁴

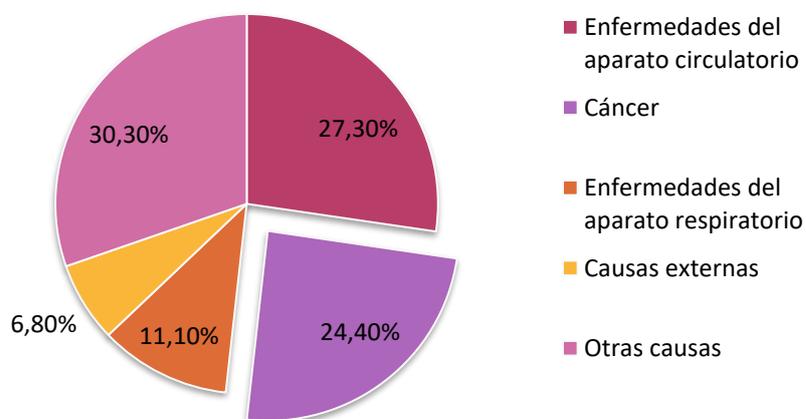


Figura 1 Gráfico que representa los porcentajes de mortalidad, según el tipo de enfermedad en Uruguay año 2016. Los cálculos fueron realizados sobre un total de 34.273 muertes. Extraído y adaptado de *Informe META, CHLCC*.

Las altas incidencias mundial y regional hacen que cada vez más se investiguen mejoras en los tratamientos, lo cual se considera que junto con un temprano diagnóstico, ^{5,6} generará un impacto directo en la disminución de las cifras reportadas.

1.3. Generalidades

Todas las células en su normal funcionamiento pasan por un proceso altamente regulado llamado ciclo celular, donde el material genético es duplicado generándose dos nuevas células. Debido a la importancia del proceso, existen controles muy estrictos para que no ocurra ningún error que pueda desencadenar un problema futuro. De manera general, estos controles regulan el número de células en los tejidos de un organismo. ⁷

Hay muchos factores relacionados con el desarrollo del cáncer, desde estilos de vida (como fumar) hasta la exposición a agentes carcinogénicos o mutaciones genéticas.⁸ El cuerpo humano está formado por millones de células que en cierto momento dejan de crecer, sin embargo hay muchas que continúan con este proceso para reemplazar otras. Esto conlleva el riesgo de sufrir mutaciones, las cuales ocurren ocasionalmente en uno o más genes cuyo producto proteico puede tener una función muy importante. ⁹

Hay factores de crecimiento que son capaces de desencadenar una cascada de señalización, fuertemente regulada por determinados genes, que le permiten a la célula avanzar desde una fase a la otra del ciclo celular, en otras palabras, proliferar cuando el organismo lo necesite. ^{2,10} Sobre estos genes clave pueden ocurrir mutaciones que generen una interrupción en la cascada de señalización, descontrolando la división celular, el crecimiento y evasión de la apoptosis, dando origen al cáncer. ⁹

Oncogenes y genes supresores de tumores son dos de los genes más importantes en los eventos antes mencionados. Los oncogenes son las formas activas de los proto-oncogenes, que en condiciones normales codifican proteínas involucradas en la proliferación, apoptosis o en ambos procesos. Dicha activación se da por mutaciones que generan onco-proteínas con mayor estabilidad o actividad que pueden provocar excesiva proliferación de las células o sobrevida de aquellas que tienen su ADN dañado. Por tal motivo, los niveles de expresión y actividad de proto-oncogenes están muy bien regulados en células sanas. ^{2, 11,12}

Luego de que se originaron las primeras mutaciones, son los genes supresores de tumores el siguiente blanco para que se desarrolle el cáncer. La función de estos es cuidar el ADN dañado a través del detenimiento de la proliferación o induciendo apoptosis. Estos genes monitorean

puntos clave que gobiernan el ciclo mitótico, como la replicación del ADN, transcripción, apoptosis y diferenciación.²

Una de las diferencias entre estos genes, proto-oncogenes y genes supresores de tumores, es que en los oncogenes basta una anomalía en una de las copias para generar un fenotipo aberrante, por lo que la mutación es de carácter dominante. Mientras que en los genes supresores de tumores, la mutación debe afectar ambas copias, siendo así de carácter recesivo.^{2, 13}

Como consecuencia de la activación de los oncogenes y la desactivación de los genes supresores de tumores, las células comienzan a replicarse sin control alguno, aumentando así su número y formando en algunos casos un agregado de células conocido como **tumor**, a través del proceso de **carcinogénesis**.¹⁴ En éste se producen alteraciones tanto celulares como moleculares, generando ventajas de crecimiento y una expansión clonal de las células dañadas.¹⁵

La carcinogénesis se presenta en tres etapas bien definidas en relación a la transformación de la célula dañada y su entorno (**Figura 2**). La primera de ellas es la **iniciación**, proceso rápido e irreparable que causa cambios genéticos haciendo que aumente la sensibilidad de la célula por su microambiente y teniendo menor sensibilidad por factores negativos, inductores de diferenciación celular y/o apoptosis.^{8, 14}

A continuación se da la **promoción**, es una etapa más lenta y hay dos componentes claves que son la inflamación crónica y el estrés oxidativo. Estos promueven la proliferación tumoral y angiogénesis, la cual es importante para el desarrollo de los **tumores sólidos**.^{8, 14, 16}

Por último se presenta la **progresión**, donde se produce la conversión gradual de células tumorales en células invasivas, aumentando el potencial metastásico. Cada etapa que ocurre en la progresión, involucra pasos de velocidad limitados, influenciados por las células no malignas del microambiente del tumor.^{8, 14, 17}

Mientras que, en la última etapa, puede ocurrir la transformación de las células en malignas, teniendo la posibilidad de adquirir ciertas características que le permiten esparcirse de su lugar de origen a otras zonas del cuerpo, a esa migración se le llama **metástasis**.¹⁸

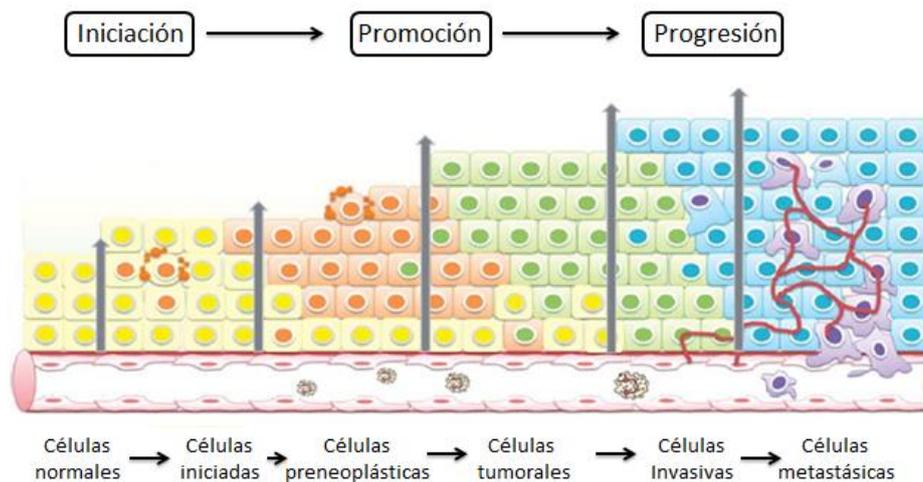


Figura 2 Etapas de carcinogénesis. Extraído y adaptado de *Pan, M y col* (2011)

Las células tumorales adoptan una serie de características que la hacen exitosa para iniciar el proceso de carcinogénesis, que podrá desencadenar una eventual metástasis. Dentro de dichas características se destacan: el **ilimitado potencial replicativo**, gracias a telomerasas que mantienen el largo de los telómeros en cada división celular; **protección de la muerte**, por evasión de apoptosis; **pérdida de inhibición del crecimiento**, favoreciendo metástasis debido a que la célula se puede desanclar de sus vecinas y crecer independientemente; **exitosa colonización**, y la **habilidad para asegurarse el suministro de nutrientes** a través de la generación de nuevos vasos sanguíneos.^{19, 20, 21}

Éste último proceso es muy importante en el caso de tumores en condiciones de hipoxia, ya que debido a las condiciones de crecimiento del mismo, los vasos sanguíneos normales no lo acompañan.^{2, 11}

1.4. Tratamientos

Los tratamientos que hoy día existen para el cáncer dependen de diferentes parámetros: grado de avance, localización y tipo de cáncer. Muchas veces se usa una combinación de ellos para lograr combatir la enfermedad.

Se pueden clasificar en dos tipos de tratamientos:

- I. **Locales:** son aquellos dirigidos a un área limitada del cuerpo o a un determinado órgano. Entre los tratamientos locales más conocidos se encuentra la cirugía, recomendada en el caso de tumores sólidos y consiste en la extirpación del mismo. Es uno de los procedimientos más seguros, en cuanto a recuperación estadísticamente.

Otra terapia muy utilizada es la radioterapia, que se basa en el uso de altas dosis de radiación para destruir y reducir tumores principalmente. ^{22, 23}

- II. **Sistémicos:** en este tipo de tratamientos se administran sustancias que circulan por el torrente sanguíneo afectando células de todo el cuerpo. La quimioterapia es el uso de medicamentos que afectan la replicación del ADN o la división de las células en crecimiento. Su objetivo es evitar la propagación de las células malignas o eliminarlas y reducir el tamaño tumoral. Por el contrario, la terapia hormonal, enlentece o detiene el crecimiento de cánceres que usan hormonas para avanzar. En el caso del cáncer de mama, estas células son positivas a los receptores de hormonas como la progesterona y el estrógeno, ^{24, 25} porque poseen proteínas que se pueden encontrar en el interior o sobre las células cancerígenas y que se unen a ellas. Por último la terapia dirigida, la cual consta del uso de medicamentos micro-moleculares, que interfieren sobre blancos moleculares, importantes en el crecimiento, avance y diseminación del cáncer. ^{22, 26}

1.5. Hipoxia tumoral

La **hipoxia** es característica de tumores sólidos, los cuales se identifican como una masa de células con particularidades que se irán desarrollando a continuación.²² Este tipo de tumores representan aproximadamente un 90% de todos los cánceres humanos. ^{27, 28}

Los tumores que presentan esta anomalía tienen tres zonas bien diferenciadas, donde la zona hipóxica se muestra como la parte más interna de la masa tumoral (**Figura 3**).

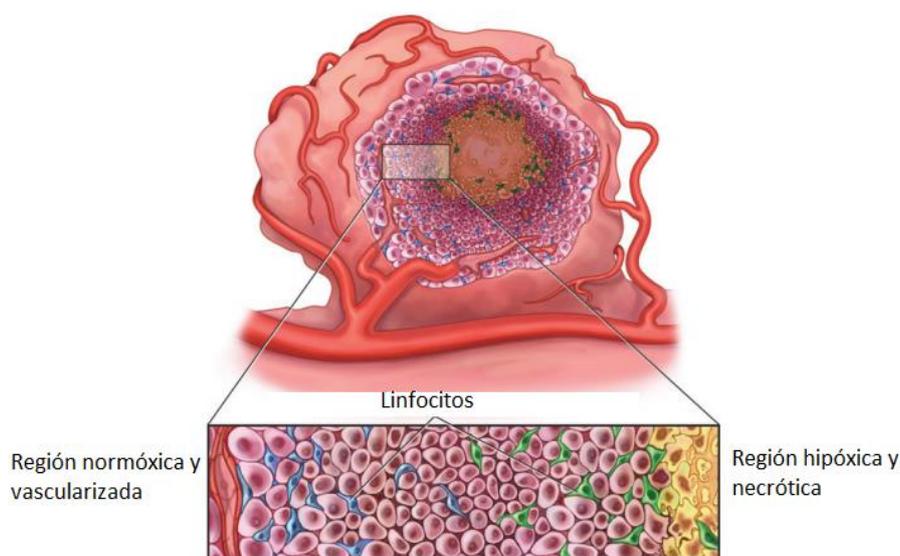


Figura 3 Representación de las zonas de tumor hipóxico. De izquierda a derecha zona óxica a zona hipóxica. Extraído y adaptado de *Gurusamy, D. y col (2017)*²⁹

Dichas zonas se caracterizaron en función de la distancia desde el vaso sanguíneo hasta el borde necrótico.^{30,31} La primera de ellas es la **zona óxica** donde la concentración de oxígeno y nutrientes es suficiente para que las células proliferen, tiene un diámetro aproximado de $100\mu\text{M}$.³⁰

A medida que la distancia del vaso que provee nutrientes aumenta, la proliferación comienza a tener más dificultad, entrando paulatinamente en un entorno en hipóxico. Dicha zona es caracterizada por una distancia de entre 100 y $150\mu\text{M}$. Para lograr adaptarse a este entorno, las células modifican algunas de sus rutas metabólicas,³² como ser la expresión de genes que están involucrados en el metabolismo y transporte de glucosa,³³ la inhibición o pérdida de función de p53, que estimula la muerte celular en respuesta a condiciones de hipoxia,³⁴ y la utilización de glucólisis y fermentación anaeróbica como fuente de energía.³⁵

Por último, la zona anóxica a distancias mayores a $150\mu\text{M}$ donde las células ya no pueden sobrevivir a estas condiciones y comienzan a necrosarse.³²

La caracterización de estas zonas es posible gracias a estudios que miden la presión parcial de oxígeno, este valor es de entre 40 y 60mmHg para tejidos normales comparado con 10mmHg o menos para tumores hipóxicos (Figura 4).^{27,36} Además, se ha reportado que la distancia de difusión del oxígeno es de aproximadamente $150\mu\text{M}$, ya que la distancia entre los vasos sanguíneos y el límite de las células necróticas es relativamente constante.³⁶

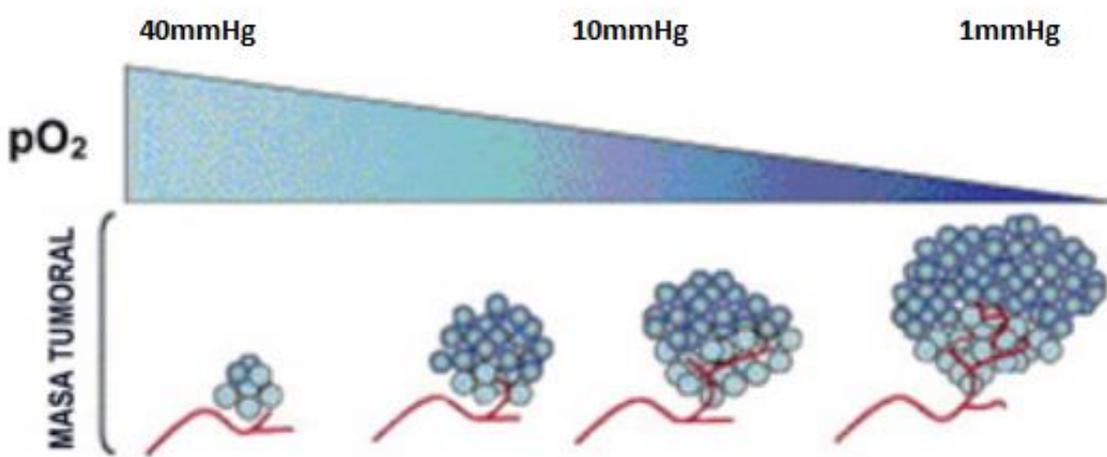


Figura 4: Representación de la disminución de la $p\text{O}_2$ con el progreso de la masa tumoral. Extraído de: Boticario, C y col (2010)³⁷

1.5.1 Angiogenesis

Las células tumorales, así como las sanas, necesitan nutrientes, oxígeno y deshacerse de sus desechos metabólicos a medida que comienzan a expandirse. Dichas necesidades en la progresión tumoral son satisfechas por la neovascularización asociada a tumor generada por el proceso de angiogenesis.³⁸ El crecimiento tumoral es dependiente de este proceso.³⁹ Los nuevos vasos sanguíneos tienen una morfología muy particular, son irregulares, tortuosos y alargados y tienen terminaciones ciegas con revestimientos endoteliales incompletos (Figura 5); a su vez hay un aumento de la permeabilidad vascular y la circulación sanguínea es irregular.^{40, 41, 42}

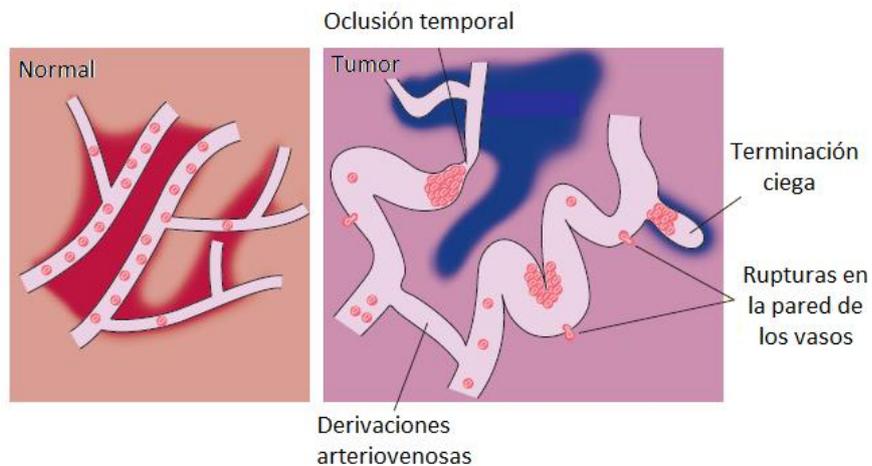


Figura 5 Comparación de vasos sanguíneos en condiciones normales y en tumor. Extraído y adaptado de Brown, J.M. (2000)

Algunas señales que activan estos procesos son: estrés metabólico (baja presión de oxígeno, bajo pH e hipoglicemia), estrés mecánico (debido a la presión generada por la proliferación de las células, entre otros), respuesta inmune/inflamatoria, mutaciones genéticas y cambios epigenéticos. Como resultado, las concentraciones de oxígeno y nutrientes son menores en células tumorales generándose las diferentes zonas mencionadas en el apartado anterior.^{40, 42,}

43

La baja presión de oxígeno es una de las señales para que se desencadene la angiogenesis. En estas condiciones, se ve afectada la expresión de muchos genes involucrados en el proceso. Entre estos, el más estudiado es el factor de transcripción inducible por hipoxia (**HIF-1**), un heterodímero formado por dos proteínas, **HIF-1 α** y **HIF-1 β** . HIF-1 α se ve incrementada en condiciones de hipoxia y su actividad está fuertemente regulada a nivel transcripcional y post-traduccional. Mientras que HIF-1 β se expresa tanto en estas condiciones como en normoxia.^{44,}
^{45, 46} Este factor, HIF-1, estimula la transcripción de genes para eritropoyetina, el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF implicado en el proceso de angiogenesis), enzimas

involucradas en la vía glicolítica y proteínas de transporte de glucosa, entre otras, que tienen sitios de unión para HIF-1 en su región promotora.^{47, 48, 49}

En condiciones normales de niveles de oxígeno, la presencia de HIF-1 α es casi indetectable debido a su rápida degradación. Esta proteína tiene dos residuos de prolina conservados en la región de degradación dependiente de oxígeno, que pueden ser hidroxilados por prolil hidroxilasas.^{47, 50, 51} HIF-1 α es así reconocido por moléculas de pVHL (Von Hippel-Lindau, gen supresor tumoral), que forma parte del complejo E3 ubiquitina ligasa, convirtiéndolo en objetivo para ser degradado en el proteosoma.^{52, 53}

Las enzimas que modifican el heterodímero necesitan de hierro y oxígeno para funcionar, por lo que en hipoxia los residuos de prolina no son hidroxilados y por ende HIF-1 α no es degradado.^{53, 54} HIF-1 α interacciona ahora con co-activadores de transcripción, estabilizándose y traslocándose al núcleo donde se heterodimeriza con la subunidad HIF-1 β . Allí comienza a activar genes implicados en: adaptación a hipoxia, supervivencia celular, angiogénesis y metástasis.^{55, 56}

De esta manera es que en el marco de esta tesis se buscan estudiar los efectos de FNZ, bajo condiciones en las que HIF-1 α se acumula y se convierte en un impulsor del desarrollo y agresividad tumoral.

1.5.2 Quimio y radio-resistencia en condiciones de hipoxia

Una de las problemáticas de la condición de hipoxia, es que estas células son resistentes a terapias convencionales. La radiación ionizante genera daño en el ADN, el oxígeno presente en los alrededores reacciona con los radicales libres formados, tales como radicales hidroxilo (OH \bullet) y superóxido (O $_2$ \cdot^-) haciendo el daño permanente, conduciendo a la muerte de las células tumorales o cambios que impiden la división celular. Cuando el tejido se encuentra oxigenado el oxígeno potencia la acción de estos radicales mejorando, por lo tanto, la eficacia de la radioterapia. Particularmente, cuando no hay oxígeno, los radicales libres reaccionan con donadores de hidrógeno, por ejemplo tioles, que reparan la lesión.^{27, 57, 58}

Dado el rápido crecimiento de la masa tumoral, también hay cierta resistencia hacia los fármacos antitumorales por dos razones, principalmente: las células hipóxicas se encuentran más alejadas de los vasos sanguíneos, vía por la cual llega el fármaco a la célula problema; y que la mayoría son efectivas sobre células en rápida proliferación, lo cual no ocurre con las

tumorales, ya que la fracción de células en activa proliferación disminuye a medida que aumenta la distancia desde los vasos sanguíneos.^{27, 40}

A pesar de que la hipoxia se ha planteado como un problema hasta el momento, actualmente se viene estudiando como una ventaja para tratar tumores sólidos, ya que permitiría desarrollar compuestos que solo actúen sobre células bajo estas condiciones, procurando no afectar las células sanas.

Es así que se plantea, el uso de pro-fármacos bio-reducibles o citotoxinas selectivas en hipoxia.

1.6. Pro-fármacos bio-reducibles

La idea de hipoxia como ventaja en terapias para el cáncer fue propuesta en primera instancia por Sartorelli y su grupo en el año 1972.⁵⁹ Como forma de explotar esta característica destacable de tumores sólidos, es que se han desarrollado una variedad de citotoxinas selectivas en hipoxia.^{60, 61, 62}

La diferencia más destacable entre células sanas y tumorales es el **microambiente**, confiriendo así selectividad, lo que abre oportunidades a la hora del desarrollo de fármacos, ya que se pueden generar compuestos “selectivos” para microambientes tumorales.⁶³

Estos compuestos, particularmente pro-fármacos activados por hipoxia, son citotoxinas enmascaradas, que necesitan para su activación escasa o ausencia total de oxígeno y actividad enzimática vía reducción de un electrón. En este sentido, se han descrito reductasas que realizan la catálisis vía un electrón, como la citocromo P450 y otras vía dos electrones como la DT-diaforasa.^{64, 65} Cabe destacar que dicho proceso de reducción, por parte de las reductasas, puede ser inhibido por la presencia de oxígeno ya que se genera competencia por el único electrón de la especie reducida, y la eliminación de éste hace que estos compuestos no se puedan reducir.⁶⁵

En base a la estructura química se han clasificado estas citotoxinas en cuatro categorías, (Figura 6):

- Quinonas
- Nitroaromáticos
- *N*-óxidos de aminas alifáticas
- *N*-óxidos de aminas heterocíclicas aromáticas

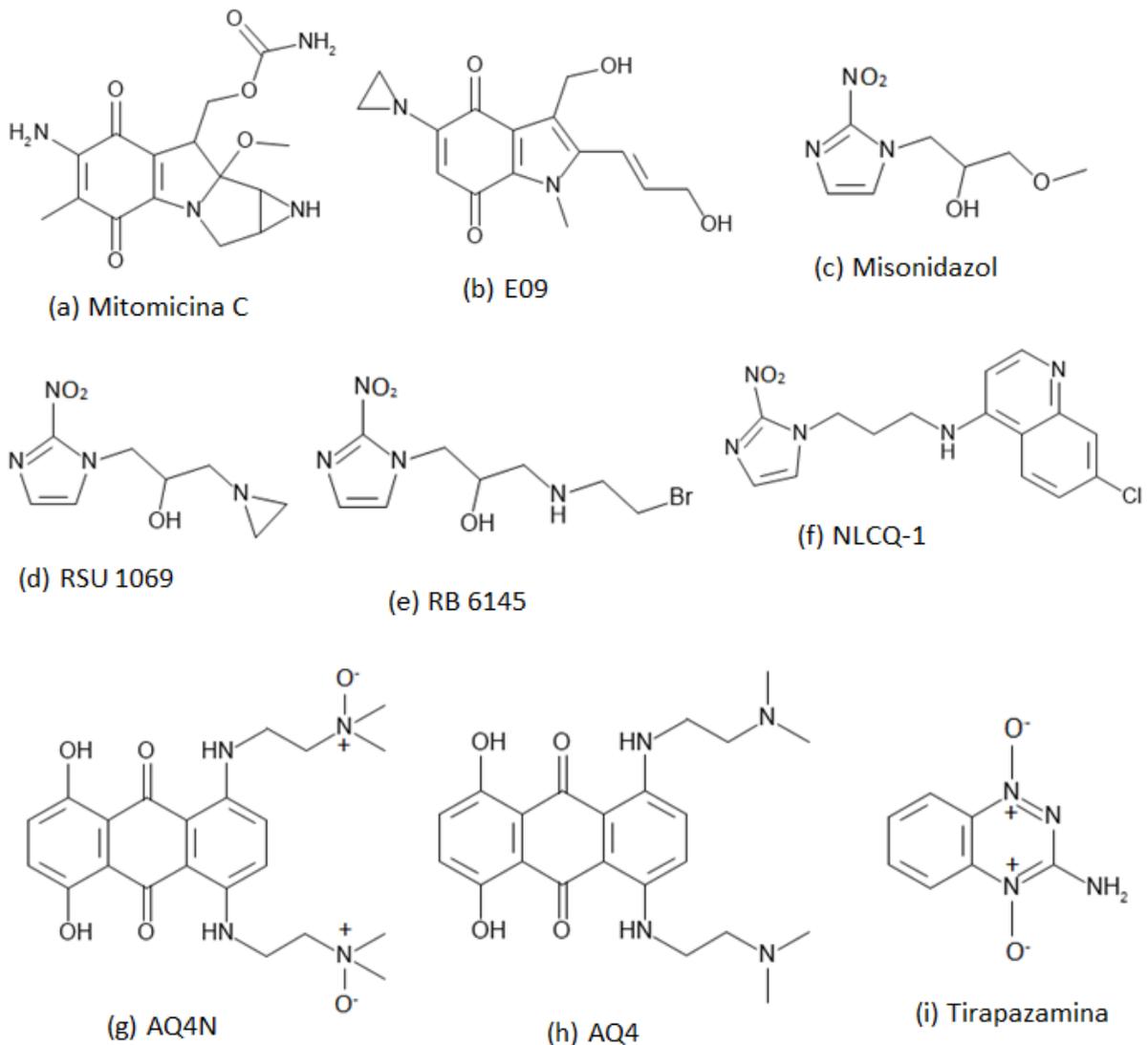


Figura 6. Ejemplos de moléculas sintetizadas de las diferentes familias de pro-fármacos bio-reducibles. Se muestra además el fármaco AQ4 que ha dado lugar al pro-fármaco AQ4N. Extraído y adaptado de: *Philips, R. (1998) Jaffar. M. y col (1999)*⁶⁶

Dentro de las quinonas la **mitomicina C** (MMC) es el compuesto líder (Figura 6a). Fue introducido en la clínica en el año 1958, pero no fue hasta 1980 que se reconocieron sus propiedades como fármaco bio-reducible.^{27, 63} La reducción puede ocurrir vía uno (citocromo P450 reductasa) o dos electrones (DT-diaforasa).⁶⁷ Mientras que la reducción vía un electrón actúa en la selectividad por hipoxia, la reducción vía dos electrones, es un proceso independiente de oxígeno, por lo que se puede dar su bio-activación en aerobiosis comprometiendo la selectividad.^{63, 68}

Las quinonas causan lesiones en el ADN que abarcan desde la generación de entrecruzamientos, hasta cortes en una de las hebras. Asimismo, dentro de este grupo también se encuentra la **porfiomicina** que es un análogo metilado de MMC y presenta una mayor citotoxicidad selectiva que su compuesto de origen.⁶⁹

Estudios combinados de este fármaco con radioterapia mostraron efectos aditivos *in vitro* y supra aditivos *in vivo*.⁷⁰ Avances en el desarrollo de esta área, llevaron a la síntesis de la **indoloquinona E09 (Figura 6b)**, la cual presentó estudios preclínicos prometedores y una selectividad en hipoxia mucho mayor.⁶³

Entre los compuestos nitroaromáticos se encuentran **nitrofuranos y nitroimidazoles**, que fueron desarrollados en primera instancia como radiosensibilizadores.⁵⁹ Estos son en general reducidos en varios pasos por varias enzimas vía un electrón. La primera reducción puede ser revertida por presencia de oxígeno, no así las subsiguientes.⁶³ El mecanismo de acción de los nitroimidazoles se basa en imitar las propiedades de afinidad por electrones del oxígeno, haciendo permanente el daño inducido por radiación.⁶⁶ El primero en desarrollarse fue el **misonidazol (Figura 6c)**, que demostró tener una mejor toxicidad selectiva hacia células hipóxicas en comparación con MMC,⁶³ pero cierta neuro-toxicidad, por lo que su uso es en limitadas dosis.⁶⁶

Derivados de imidazoles con grupos aziridina alquilantes también se han desarrollado.^{71, 72, 73} El derivado **RSU 1069 (Figura 6d)**⁶⁴ presentó muy buena selectividad en hipoxia, que además, aumenta la respuesta de las terapias por radiación antes o después de su administración, pero presenta toxicidad severa hacia el tracto intestinal.⁶³ Es así que se sintetizó **RB 6145 (Figura 6e)** como alternativa, con excelente toxicidad selectiva por células en hipoxia. Sin embargo, se describieron casos de retinopatía irreversible en dichas condiciones.⁶⁶ Finalmente, en esta categoría se incluye al compuesto **NLCQ-1 (Figura 6f)**, que utiliza las reductasas citocromo P450 y b₅. Se ha comprobado que al tratar células V79 con dicho compuesto es casi 400 veces más selectivo hacia condiciones de hipoxia, igualmente este potencial y selectividad se ha visto que varía dependiendo del tipo de tumor.⁷⁴

El tercer grupo de pro-fármacos bio-reducible es el de los **N-óxidos**. El compuesto **AQ4N (Figura 6g)** es un N-óxido alifático cuya bio-reducción enzimática por parte de la citocromo P450 reductasa, lleva a la generación **AQ4 (Figura 6h)**, quien presenta una alta afinidad por el ADN, además de actuar como un inhibidor potente de la topoisomerasa II.^{63, 65, 74} La alta afinidad de unión de AQ4 por el ADN, no permite que éste difunda fuera del microambiente tumoral, resultando en una mínima toxicidad sistémica. En cuando a su acción conjunta con terapias tradicionales, se ha visto mejoras en los efectos antitumorales al ser usado con radiación ionizante, cisplatino y ciclofosfamida. En dicho caso se ha descrito que el daño se hace persistente, demostrando así la alta vida media de este compuesto.⁷⁴ También se ha

demostrado que AQ4 se mantiene activo a pesar de que el grado de hipoxia que lo generó sea transitorio.^{75, 76}

Es de destacar que en la clínica, el primer fármaco citotóxico bio-reducible fue **Tirapazamina (TPZ)** (Figura 6i).⁷⁷ Este compuesto pertenece a los *N*-óxido de heterocíclicos aromáticos. Su reducción enzimática es llevada a cabo por la citocromo P450 reductasa y más recientemente se demostró que también por NOSII (óxido nítrico sintasa II).⁷⁸ Particularmente genera un radical, que en ausencia de oxígeno, sufre un rearrreglo con pérdida de agua, generando una entidad que daña el ADN llevando a la muerte celular.⁶³ La muerte es ocasionada por ruptura de una o ambas hebras o por generación de aberraciones cromosómicas (Figura 7).⁷⁸ TPZ mostró funcionar óptimamente a bajos niveles de oxígeno (lo que puede estar asociado a una alta concentración de enzimas en la matriz nuclear),⁷⁹ sugiriendo que puede actuar bajo tensiones de oxígeno intermedias.⁶³ Su comportamiento conjunto con radiación y agentes quimioterapéuticos arrojó muy buenos resultados.⁷⁷

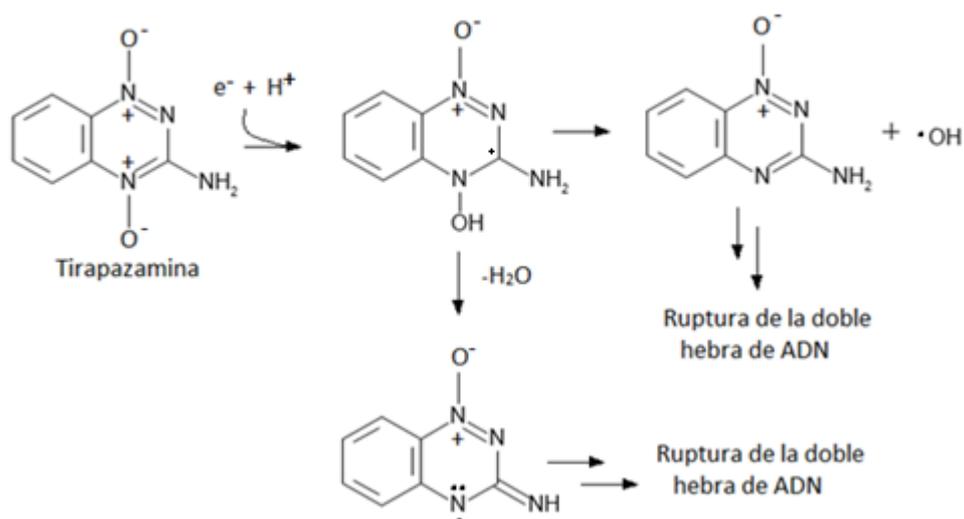


Figura 7 Representación del mecanismo de acción de TPZ, extraído y adaptado de *Cerrecetto, H. y col (2006)*

1.7. Agentes intercalantes de ADN

El ADN ha sido, por muchos años, la molécula blanco en el diseño de agentes con propiedades quimioterapéuticas. Estos agentes pueden interactuar con el ADN cambiando su conformación o inhibiendo procesos esenciales como son la transcripción o duplicación, evitando así la propagación de la enfermedad.⁸⁰

La interacción con el ADN se puede dar de dos maneras: por intercalación o por unión a ranura. La intercalación mediante interacciones no covalentes (hidrofóbicas, iónicas, enlaces de hidrógeno y van der Waals) fue demostrada por Lerman en el año 1961 entre la pro-flavina (Figura 8a) y el ADN.⁸¹ Se describe como un proceso mediante el cual compuestos con sistemas planos aromáticos (cromóforos) se insertan entre los pares de bases del ADN adyacentes.⁸² Esta inserción genera un descenso en el giro helicoidal y un alargamiento de la macromolécula, acompañado de un costo energético importante pero que, sin embargo, resulta en constantes de asociación del orden de 10^{11} de las interacciones no covalentes antes mencionadas.^{83, 84}

La estructura básica para los agentes intercalantes es la de anillos aromáticos planos con una superficie tal que puede insertarse entre las bases del ADN. La mínima superficie necesaria para que el proceso sea efectivo, es la que presenta el naftaleno, un sistema de dos anillos fusionados.⁸⁵ La interacción puede mejorar aún, teniendo en cuenta que posiciones β del naftaleno, están sustituidas con anillos bencénicos que permitan la conjugación con el sistema condensado. La característica que tienen en común estas estructuras es la de un sistema aromático π - deficiente de dos o más anillos de 6 eslabones.⁸⁶ La interacción de los anillos policíclicos con el ADN ocurre en general entre el sistema de electrones π de la molécula y el anillo heterocíclico del par de bases.⁸⁷

El mecanismo de acción de los agentes intercalantes no es del todo claro, aunque hay estudios que relacionan este mecanismo con un “envenenamiento” de las enzimas topoisomerasas, ya que son las responsables de responder a las perturbaciones topológicas de la molécula de ADN, provocando rupturas en las hebras para liberarla de las tensiones a las que el agente la somete.^{80, 82}

Dentro de los agentes intercalantes reconocidos como anticancerígenos, se encuentran las antraciclinas. Un ejemplo de ellas es la Mitoxantrona (Figura 8b), que se usa en el tratamiento de leucemias, cáncer de mama y ovarios y aparenta presentar un menor riesgo cardiotoxico comparado con Doxorubicina (Figura 8c). Ambas tienen alta afinidad por el ADN, pero su difusión a los tejidos es muy baja.^{88, 89} Es por ello que se buscan desarrollar agentes con una moderada afinidad por el ADN y cuyo coeficiente de difusión por los tejidos sea tal que permita su uso en tumores sólidos.⁹⁰

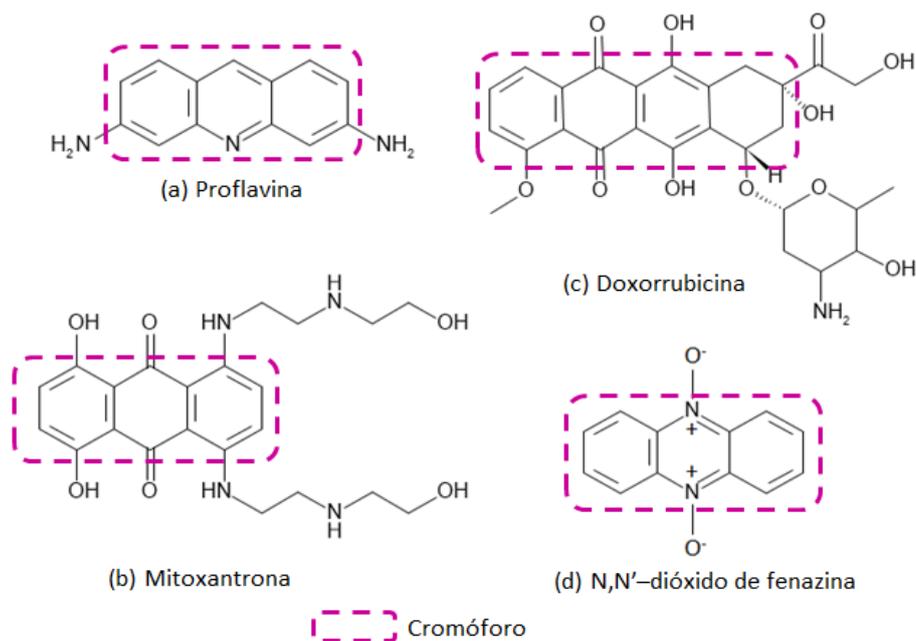


Figura 8 Agentes intercalantes desarrollados para el tratamiento del cáncer. Extraído y modificado de Ibrahim, M. y col (2018)

En este sentido, en los últimos años en nuestro grupo han desarrollado compuestos derivados de *N,N'*-dióxido de fenazina⁹¹ (Figura 8d) que podrían tener la capacidad de intercalarse en el ADN y de presentar citotoxicidad selectiva en condiciones de hipoxia. Estos agentes presentan grupos *N*-óxido capaces de bio-reducirse aumentando así su potencial para intercalarse, otorgándole capacidad citotóxica.

1.8. Modelo experimental para el estudio de cáncer de mama

No hay duda que el uso de animales de experimentación ha aportado las bases para dar soluciones en cuanto a la salud de los seres humanos, siendo de gran ayuda en la comprensión de la patogénesis de muchas enfermedades a nivel mundial. Tanto es así, que en los procesos de investigación, desarrollo y aprobación de fármacos, se exigen ensayos en organismos vivos (*in vivo*) y en células o tejidos (*in vitro*).⁹²

El animal de laboratorio se define como cualquier especie animal (mamífero, ave, reptil, anfibio o pez) que se mantiene bajo condiciones determinadas y se utiliza con fines científicos.^{93, 94} Su uso exige técnicas reglamentadas relacionadas al estado de bienestar del animal y a disminuir al máximo posible su dolor, sufrimiento, angustia o agravio.⁹⁵

En el marco legal del uso de animales con fines de docencia e investigación, se establecen en Uruguay la Ley 18.611 titulada “Utilización de animales de experimentación, docencia e investigación científica”. En el cual se enmarcan los lineamientos para minimizar o evitar el sufrimiento y dolor de los animales, se detallan las directivas de su uso y manejo en todo el territorio nacional. Dicha ley dispone a su vez la creación de la Comisión Nacional de Experimentación Animal (CNEA),⁹⁶ la cual se encarga del registro de instituciones y personas que usen animales para docencia, experimentación y/o investigación. En el marco de acreditaciones institucionales o personales, según corresponda, procurando la habilitación locativa así como capacitación correspondiente del personal.⁹⁷

La institución encargada de asesorar, otorgar habilitaciones relacionadas con la Universidad de la República, es la Comisión Honoraria de Experimentación animal (CHEA) quien hará de nexo entre las actividades institucionales y la CNEA.⁹⁸ Es así, que en el marco de la presente tesis de grado se trabajó bajo el protocolo aprobado por la institución Facultad de Ciencias.

De entre los animales que se emplean en experimentación, el ratón es el más utilizado (Figura 9), en investigación biomédica. Ya que es un muy buen modelo para el estudio de enfermedades bacterianas, víricas, genética y diferentes tipos de cánceres⁹⁹

El ratón se encuentra dentro del género *Mus*, el cual engloba una gran variedad de especies y subespecies, dentro de las que se encuentra el ratón que se usa en experimentación, perteneciente a la especie *Mus Musculus*.¹⁰⁰



Figura 9 Fotografía tomada en el Laboratorio de Experimentación Animal del CIN, representando el modelo de experimentación objeto de la presente tesis. Sexo: Hembra, cepa: Balb/c

Desde que Robert Hooke en 1664 utilizó al ratón para estudiar las consecuencias biológicas de un aumento en la presión del aire,¹⁰¹ es que se han explorado todas sus ventajas como

reactivo biológico. En primer lugar es un animal pequeño, lo cual facilita su mantención, manipulación y control de las condiciones del micro y macro-ambiente en el cual se encuentra,⁹⁵ tienen un corto tiempo de generación y un gran rendimiento reproductivo.¹⁰⁰ Además, muchos de sus procesos bioquímicos son similares al humano, por tratarse de un mamífero.¹⁰²

Para el estudio del cáncer hay una gran cantidad de modelos murinos que abarcan diferentes cepas co-sanguíneas, mutaciones espontáneas, ratones transgénicos y knock out (KO). Estos modelos, vienen siendo reportados, ya que brindan la posibilidad de estudiar qué efectos tienen las mutaciones que inducen el cáncer, además de poder llevar a cabo todo tipo de estudio y ensayos terapéuticos *in vivo*.⁹⁵

La cepa utilizada en este trabajo, Balb/c, alcanzan la pubertad a las 4-5 semanas y llegan a la adultez pesando entre 28 y 30 g (habiendo una leve diferencia entre machos y hembras). Tienen un período de gestación de entre 19 y 21 días, alcanzando un máximo de 5 crías por camada.^{100,103}

2. Antecedentes

2.1 *N*-óxido de fenazina

Existen muchas moléculas con la capacidad de bio-reducirse que contienen en su estructura el grupo *N*-óxido.^{63, 65, 74, 76} Este grupo puede formarse por la adición de un átomo de oxígeno al par de electrones solitario presente en un átomo de nitrógeno.⁶⁰

En tumores sólidos, donde la característica más destacable es la hipoxia, hay sobre-expresión de las enzimas reductasas, por lo que la bio-reducción del grupo *N*-óxido se ve favorecida.¹⁰⁴ Dicho grupo, da lugar a las citotoxinas selectivas en hipoxia, que pueden ser reducidas vía uno o dos electrones. Cuando la reducción es vía un electrón, se genera el radical nitróxido que produce daño en el ADN.⁶⁵ Cuando es vía dos electrones, el producto es una amina aromática, que a pH fisiológico se protona, lo cual se ve favorecido por la acidez del microambiente de las células tumorales (Figura 10). A su vez, la carga positiva que ahora adquiere la molécula, la hace más afín al ADN, genera una baja de su lipofilia y de la solubilidad de la bicapa lipídica. Este aumento de afinidad por el ADN e impedimento de atravesar la bicapa asegurarían la selectividad hacia el tejido enfermo.⁶⁰

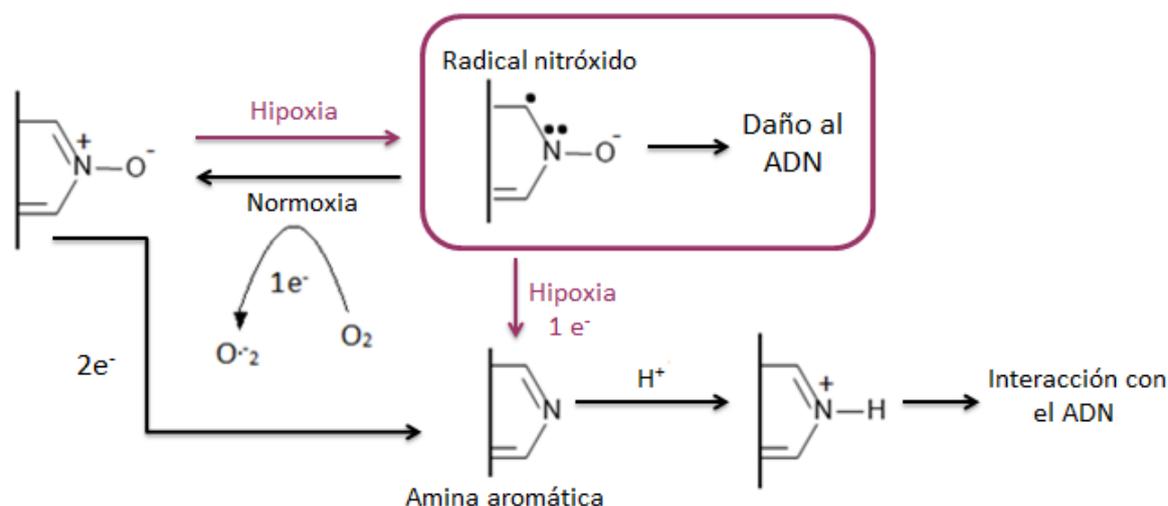


Figura 10 Esquema representativo de la bio-reducción de *N*-óxidos aromáticos. Extraído y modificado de Cerecetto, H. y col (2006)

Se han desarrollado muchos agentes anti-tumorales cuyo principal mecanismo de citotoxicidad es intercalarse entre las bases del ADN y generar daño, ejemplo de ellos son Tirapazamina y Mitoxantrona.⁶⁵ Estructuralmente estos compuestos comparten similitud en cuanto al cromóforo plano que lo conforma, que consiste en un sistema aromático de tres anillos que le permiten intercalarse entre las bases.^{77,88} La intercalación es la inserción del sistema

cromóforo poli-aromático plano entre los pares de bases de la doble hélice de ADN, impulsado por las interacciones de apilamiento.¹⁰⁵

En el Laboratorio de Química Orgánica Medicinal se ha trabajado en el desarrollo de diferentes series de compuestos derivados de *N*-óxido como potenciales agentes bio-reducibles.¹⁰⁶⁻¹¹⁸ Particularmente, se pueden destacar los derivados de *N,N'*-dióxido de fenazina, que se han descrito como compuestos híbridos ya que combinan la capacidad de presentar citotoxicidad selectiva en hipoxia y de poder intercalarse en las bases del ADN.¹¹⁴⁻¹¹⁷

Al igual que su compañero de grupo, la tirapazamina, este sistema presenta dos grupos *N*-óxido que son excelentes candidatos a reducirse en condiciones de hipoxia y convertirlos así en pro-fármacos bio-reducibles. Además, el anillo tricíclico que presenta, también se lo puede encontrar en el agente intercalante Mitoxantrona, entre otros. Es así que estos sistemas reúnen las características de ser compuestos híbridos.

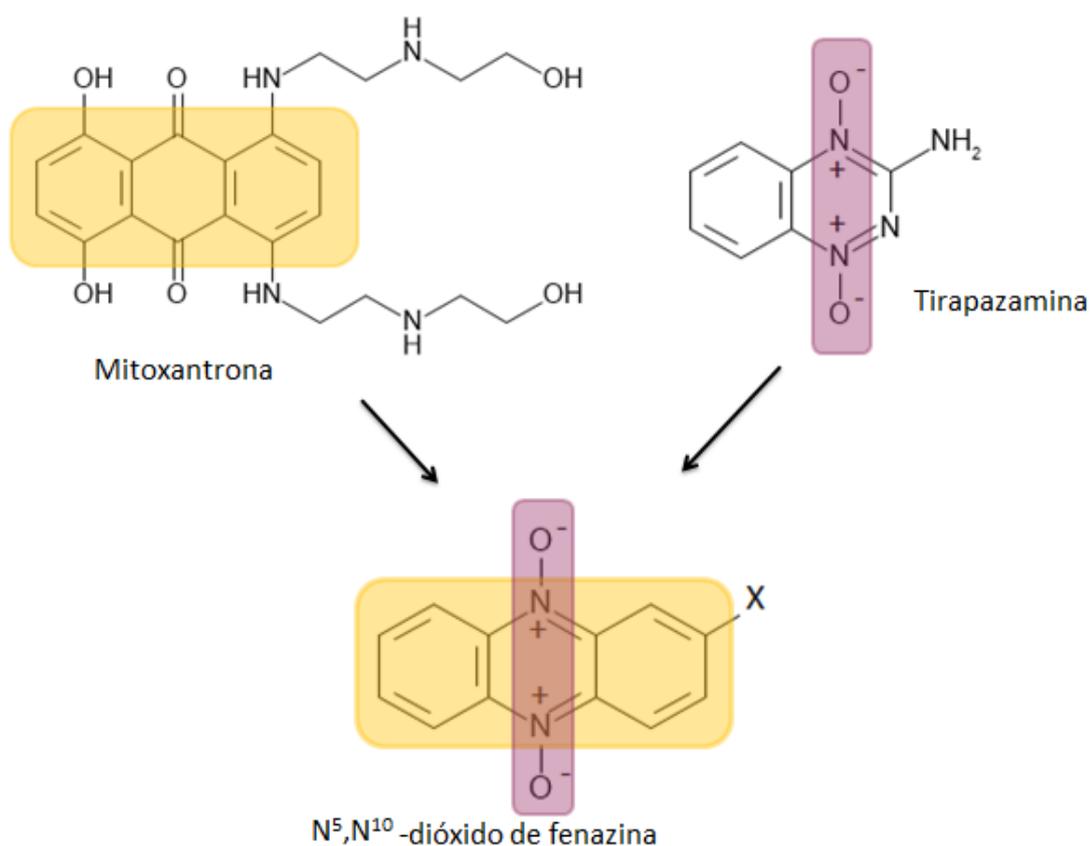


Figura 11 Diseño de potencial pro-fármaco bio-reducible en base a dos fármacos ya descritos a modo de potenciar su actividad citotóxica específicamente en condiciones de hipoxia tumoral. Extraído y adaptado de *Tesina de posgrado Lavaggi, M.L. (2009)*¹¹⁹

3. Objetivos

General

- Estudiar la capacidad anti-tumoral del profármaco N^5, N^{10} -dióxido de 2-amino-7(8) fluorofenazina (**FNZ**) (Figura 12) en el modelo murino de cáncer de mama metastásico inducido por células 4T1

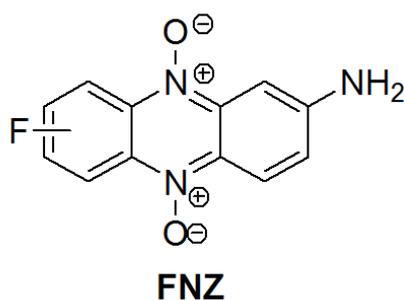


Figura 12 Estructura de N^5, N^{10} -dióxido de 2-amino-7(8) fluorofenazina

Específicos

- Escalado de la síntesis de **FNZ** y caracterización estructural del producto
- Estudio del agente FNZ *in vivo* a través:
 - Del análisis de la supervivencia de los animales
 - De la evolución del tamaño tumoral
 - De los análisis clínicos
- Análisis *post-mortem* a través de:
 - Estudios de anatomía patológica
 - Estudios de análisis Clínicos

4. Materiales y métodos

4.1 Escalado de la síntesis de FNZ y caracterización físico-química.

En el siguiente apartado se detallarán los procedimientos experimentales que llevaron a la obtención del producto final, así como del intermedio de reacción.¹²⁰

Los disolventes que lo requerían fueron previamente destilados por métodos convencionales y los reactivos químicos fueron obtenidos de fuentes comerciales: Aldrich, Sigma, Merck, Dorwil, entre otros.

La caracterización del intermedio y producto finales se realizó mediante ¹H RMN en un equipo BRUKER DPX-400 (400MHz). Se utilizó como disolvente DMSO deuterado y TMS como referencia.

Para la síntesis del **intermedio de reacción**, 5-fluorobenzofuroxano (**BFX**), se coloca en un balón una disolución de 4-fluoro-2-nitroanilina (2 g, 13 mmol) en MeOH (143 mL) en baño de hielo y se agita con pastilla magnética durante 10 minutos. Luego se agrega una disolución acuosa de NaOH (50 %) (21.5 mL) gota a gota y posteriormente se adiciona una disolución acuosa de NaClO (producto de origen comercial con fines domésticos) (86.0 mL) también gota a gota. Para ajustar el pH entre 5.5 y 6.0 se agrega disolución acuosa de HCl (50 %) (44.0 mL). Los restos de 4-Fluoro-2-nitroanilina que quedaron sin reaccionar se filtran.

A la disolución obtenida anteriormente se le agrega H₂O (30.0 mL) y se realizan tres extracciones con EtOAc (80.0 mL cada una). Posteriormente la fase orgánica se deja secar con Na₂SO₄ anhidro y luego se evapora a vacío hasta eliminar el disolvente. El residuo obtenido se liofiliza por 72 h, obteniéndose un sólido naranja/amarillento (1.68 g, 85 %). Se procede a su caracterización por ¹H RMN.

El intermedio, **BFX**, (5 g, 32 mmol) se coloca en un balón con *p*-aminofenol (2.83 g, 26 mmol) y DMF anhidro (8.0 mL) se mantiene bajo atmósfera de nitrógeno y baño de hielo en agitación magnética durante 10 minutos. Se adiciona Et₃N (4.5 mL) y se continúa la agitación por 24 h a temperatura ambiente, luego 24 horas a -20°C. Al compuesto obtenido se le hacen dos lavados con *n*-hexano (2 mL cada uno), se filtra y se hacen dos lavados más con Et₂O (10 mL cada uno). Se deja en desecador y el precipitado se liofiliza por 72 h. El sólido violeta oscuro, **FNZ**, (3.6 g, 56 %) se caracteriza por ¹H RMN y se almacena para su posterior uso.

4.2 Cultivo de la línea celular

La línea celular 4T1 (CRL-2539™) de tumor de mama metastásico fue obtenida de la empresa ATCC®. Proviene de la glándula mamaria de ratón, *Mus musculus*, cepa Balb/c, es de morfología epitelial y crece en forma adherente (Figura 13). Es un tumor que simula estadio IV de cáncer de mama humano.¹²¹

Las células se cultivaron en medio completo RPMI suplementado con 10% de SFB y se dejó en incubadora humificada con 5% de CO₂ a una temperatura de 37°C procurando esterilidad. Cuando las células alcanzaron la llamada confluencia, placa completa de células, se centrifugaron en falcón a 1000 RPM durante 5 minutos, el sobrenadante se descartó y el pellet se re-suspendió en el volumen necesario para la inoculación posterior.¹²²

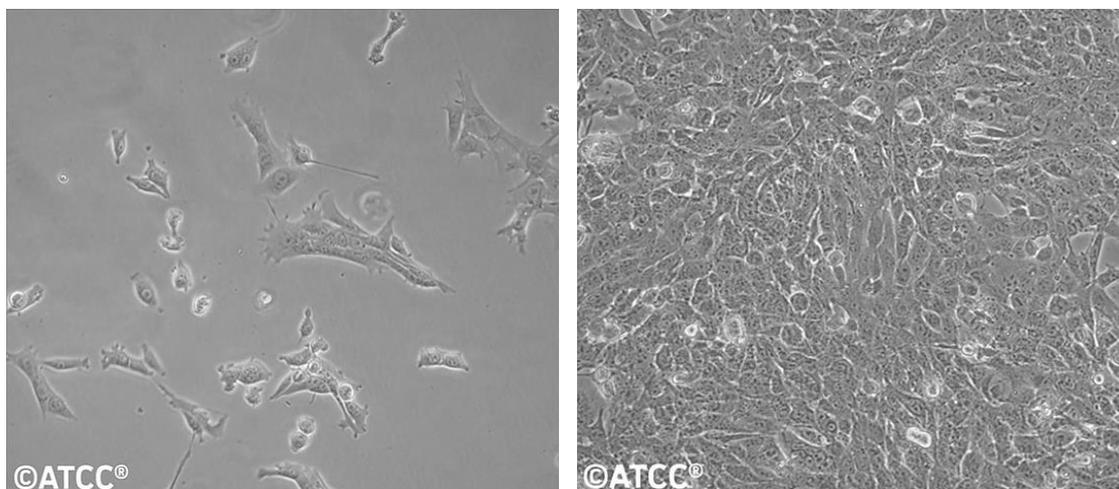


Figura 13 Imagen de microscopía óptica de la línea celular 4T1. Izquierda, células en temprano crecimiento comenzando a adherirse. Derecha, células en confluencia. Obtenido de: *página web ATCC*

4.3 Vehiculización de FNZ

Se masó 6g de FNZ y se mezcló con 3mL de una mezcla de SF:T (80)¹²³ en proporciones 4:1 (% v/v), previamente esterilizados en autoclave, en un vial de vidrio. La preparación se dejó en agitación moderada durante 24 horas. También se realizó control el cual consta de una solución SF:T(80) 4:1 (% v/v).

4.4 Estudios *in vivo*

En los estudios *in vivo* se utilizaron hembras, de la cepa Balb/c,¹²² de entre 6 y 8 semanas de edad,^{124,125} con un peso promedio de 18.3±0.6 g, criados en condiciones específicas libre de patógenos, proporcionados por la Unidad de Reactivos y Bio-modelos de Experimentación (URBE)¹²⁶ de la Facultad de Medicina. Todo el trabajo experimental se llevó a cabo en el

Laboratorio de Experimentación Animal (LEA) del Centro de Investigaciones Nucleares (CIN), bajo el protocolo número 240011-002249-15 aprobado por la Comisión Honoraria de Experimentación Animal (CHEA).¹²⁷

El responsable de la mantención y manipulación con los animales de experimentación fue Bach. Marcelo Fernández, encargado del LEA, CIN.

Condiciones generales estandarizadas: los animales se dejaron climatizar durante 5 días luego de su ingreso al laboratorio. Se colocaron en racks de ventilación controlada, con entre 15 y 20 recambios de aire / hora, ubicados de tal manera que todos se encontrarán en las mismas condiciones. La temperatura del macro-ambiente se estableció a $20\pm 2^{\circ}\text{C}$, con ciclo de luz artificial / oscuridad de 12 h y humedad controlada (50-70%).¹²⁸ En cuanto a las condiciones del microambiente, las camas contenían viruta, esterilizada por calor húmedo (121°C , 15 minutos).

Su régimen de alimentación fue *ad libitum*, con ración en pastilla proveniente de la empresa Rodek, Vitaron. El agua fue proporcionada bajo el mismo régimen, esterilizada por calor húmedo (121°C , 15 minutos), proporcionada en biberones de policarbonato con boquilla de metal inoxidable.

Los animales fueron monitoreados diariamente, teniendo en cuenta todas las condiciones de bienestar animal.¹²⁹ Se realiza y toma como referencia de bienestar el test de Irwin según la guía OECD.¹³⁰

Al finalizar los ensayos los animales fueron anestesiados con isoflurano y sacrificados mediante dislocación cervical.¹³¹

4.4.1 Caracterización de modelo tumoral

Entre 5 y 10 ratones fueron inoculados subcutáneamente en la 4ta mama izquierda con jeringa de 1 mL y aguja 25G con un volumen de 100 μL de una suspensión de células de cáncer de mama murino metastásico, línea 4T1, de concentración 7.0×10^6 cel/mL de medio RPMI.¹²²

Se verificó diariamente mediante palpación, con los dedos pulgar e índice, la aparición de tumor. Cuando el mismo fue palpable, comenzaron la toma de medidas de masa corporal y tamaño tumoral. Las medidas de masa se hicieron en una balanza específica para ratones. Las medidas de tamaño tumoral se realizaron con calibre¹²². Se tomaron medidas de los diámetros mayor (D) y menor (d). El volumen tumoral (V) se calculó según la ecuación: $V = (d^2 D) / 2$, donde **d** es el diámetro menor y **D** es el diámetro mayor.¹³²

El seguimiento del tumor se realizó mediante rayos X en un equipo In-Vivo MS FX PRO (Bruker, Billerica, USA).



Figura 14 Ratón hembra, cepa Balb/c, siendo inoculado en la 4ta mama izquierda con la suspensión de células de la línea 4T1.

Como criterio de punto final, se realizaron observaciones en cuanto a aspectos físicos y comportamentales.¹³⁰ Se tuvo en cuenta que la masa del tumor no excediera el 10% de la masa del animal y si hay una disminución en el peso, la misma no sobrepasara el 10% de la masa inicial del animal.¹³³

Se toma como inicio del ensayo el día de inoculación de células. El ensayo culminó el día 22 post-inoculación.

4.4.2 Estudio anti-tumoral

Se procedió a la inoculación de la suspensión celular de la misma forma descrita en el apartado anterior.

Una vez los tumores fueron palpables (generalmente al 5to día post-inoculación de células), comienza la administración de las formulaciones. Se formaron dos grupos de tratamiento con 7 animales cada uno: i) tratamiento con FNZ vehiculizada según se indicó en apartados anteriores, administrando 185 μ L vía intraperitoneal correspondientes a una concentración de 20mg/Kg de masa corporal; ii) control negativo del ensayo, que consistió en la administración del vehículo SF:T por la misma vía y mismo volumen. Se utilizan jeringas de 1mL, y aguja 25G.

La posología elegida para el ensayo consistió en un total de 6 dosis entregadas en un período de 16 días, con un día de descanso entre cada una de ellas y dos entre la tercera y la cuarta dosis. Es así que las dosis se administran a los días 5, 7, 9, 12, 14 y 16 de inicio del ensayo.

Las mediciones de masa corporal y tamaño tumoral se realizaron diariamente. El punto final del ensayo se definió el día 22 post-inoculación de células. En ese día se toman muestras de sangre y se realizan las correspondientes necropsias (ver apartados siguientes).

Los gráficos presentados a lo largo de este trabajo fueron realizados con el programa informático Microsoft Excel 2010 y Origin Pro 8 y el test estadístico empleado fue T-Student, con un p-valor menor de 0.1.

4.4.3 Análisis clínicos

Los análisis clínicos fueron realizados por la Q.F Cristina Pintos del Laboratorio de Análisis Clínicos de Facultad de Química.

Los animales son previamente anestesiados con isofluorano, luego se hacen tomas de sangre vía seno venoso orbitario, para posterior análisis bioquímico y hematológico de un pool de ratones (4 ratones en total por tratamiento).¹³⁴

Las muestras se mantuvieron en tubos eppendorf estériles de 1.5 mL con EDTA y heparina (al 5 %) y refrigeradas hasta su análisis.^{135,136,137}

4.5 Estudios *post-mortem*

Los estudios de este apartado fueron realizados al día 22 de inicio del ensayo. Los animales fueron sacrificados por dislocación cervical, previa anestesia con isofluorano.

Los análisis anátomo-patológicos fueron realizados por el Dr. José Pacheco perteneciente al Laboratorio de Anatomía Patológica de Facultad de Veterinaria-UdelaR.

4.5.1 Obtención de muestras para análisis patológico

Se realizó la necropsia de los dos grupos de animales según:¹³⁸

1. Previa necropsia se examina pelo, piel, orificios naturales y mucosas en busca de anomalías.
2. Palpar el cuerpo del animal para determinar la presencia de bultos (en cuyo caso hay que tener cuidado al realizar incisión).
3. Anestesiarse.
4. Colocar el animal en posición cúbito-dorsal y se fijan extremidades.
5. Realizar una primera incisión ojal en la región abdominal y se extiende hasta el mentón.

6. Realizar una segunda incisión, donde comenzó la primera rodeando la zona genital.
7. Reconocimiento y observación.
8. Aperturas de las cavidades abdominal y torácica.
9. Extirpación los órganos necesarios.

Se conservaron en formol tamponado al 10 %: tumor, hígado, bazo, corazón, pulmones, riñones y hueso (fémur), conservándose individualmente en frascos de vidrio color ámbar con tapa de rosca de plástico. Se mantuvieron a temperatura ambiente hasta su posterior análisis.

139

Los restos de muestras biológicas se mantuvieron a -20°C hasta su retiro por la empresa Aborgama, encargada de su correcto descarte.

4.5.2 Preparación de cortes histológicos

La preparación de los cortes se realiza según el siguiente protocolo:¹⁴⁰

1. Deshidratación:
 - Etanol 70 %, dos lavados de 30 minutos cada uno
 - Etanol 95 %, dos lavados de 30 minutos cada uno
 - Etanol 100 %, dos lavados de 30 minutos cada uno
2. Diafanización:
 - Cloroformo I, 1 lavado de 20 minutos
 - Cloroformo II, 1 lavado de 20 minutos
 - Cloroformo III, 1 lavado de 20 minutos
3. Impregnación:
 - Parafina I, 30 minutos
 - Parafina II, 30 minutos
 - Parafina III, 30 minutos

Dado que la parafina emite vapores que pueden ser tóxicos, este paso se realiza en campana de gases.

4. Microtomía:

El bloque de parafina, conteniendo la muestra, se moldeó sobre un soporte de manera de centrar la porción en la cual se quiere realizar el corte. La muestra debe quedar bien retenida a la base, la cual luego será colocada en el micrótopo para hacer los cortes.

Se colocó la base en el micrótopo (Biocut/Mod.1130) y se seleccionó el tamaño del grosor en μm que se quiere realizar. Se comenzó con un grosor mayor al recomendado y se fue disminuyendo gradualmente.

Una vez hecho el corte se tomó el mismo muy suavemente con un pincel y se colocó en baño a 55°C (temperatura al cual la parafina se funde pero no estropea la muestra). Se retiró la parafina de los alrededores. Se tomó un porta objeto y, sumergiéndolo en el baño, se “levantó” el corte que queda pegado por la misma humedad al porta.

Los porta objetos se dejaron previamente 20 minutos inmersos en etanol 100 %, de manera que queden bien limpios para su uso.

Los cortes realizados en este trabajo se encuentran entre los 5 a 10 μm .

5. Deparafinación: para eliminación el medio de inclusión

- Xilol I, 5 minutos
- Xilol II, 5 minutos

6. Rehidratación:

- Etanol 95 %, 5 minutos
- Etanol 70 %, 5 minutos
- Agua desionizada, 5 minutos

7. Coloración nuclear:

- Hematoxilina de Mayer, 10 minutos
- Agua desionizada, 1 enjuague
- Virado en agua del grifo, 10 minutos
- Agua desionizada, 2 enjuagues

8. Coloración citoplasmática:

- Eosina amarillenta alcohólica al 0.5 %, 4 minutos

9. Deshidratación y montaje:

- Alcohol 95 %, dos lavados de 1 minuto cada uno
- Alcohol 100 %, dos lavados de 1 minuto cada uno
- Xilol, 2 minutos

Se dejó secar las muestras sobre un papel absorbente. Una vez secas, se colocaron sobre un porta objetos, a los alrededores de la muestra, medio de montaje y se cubrió la misma con un cubre objetos.

Dicha técnica contó con el asesoramiento de la Dra. María José Arezo de la sección Biología Celular, Facultad de Ciencias-UdelaR.

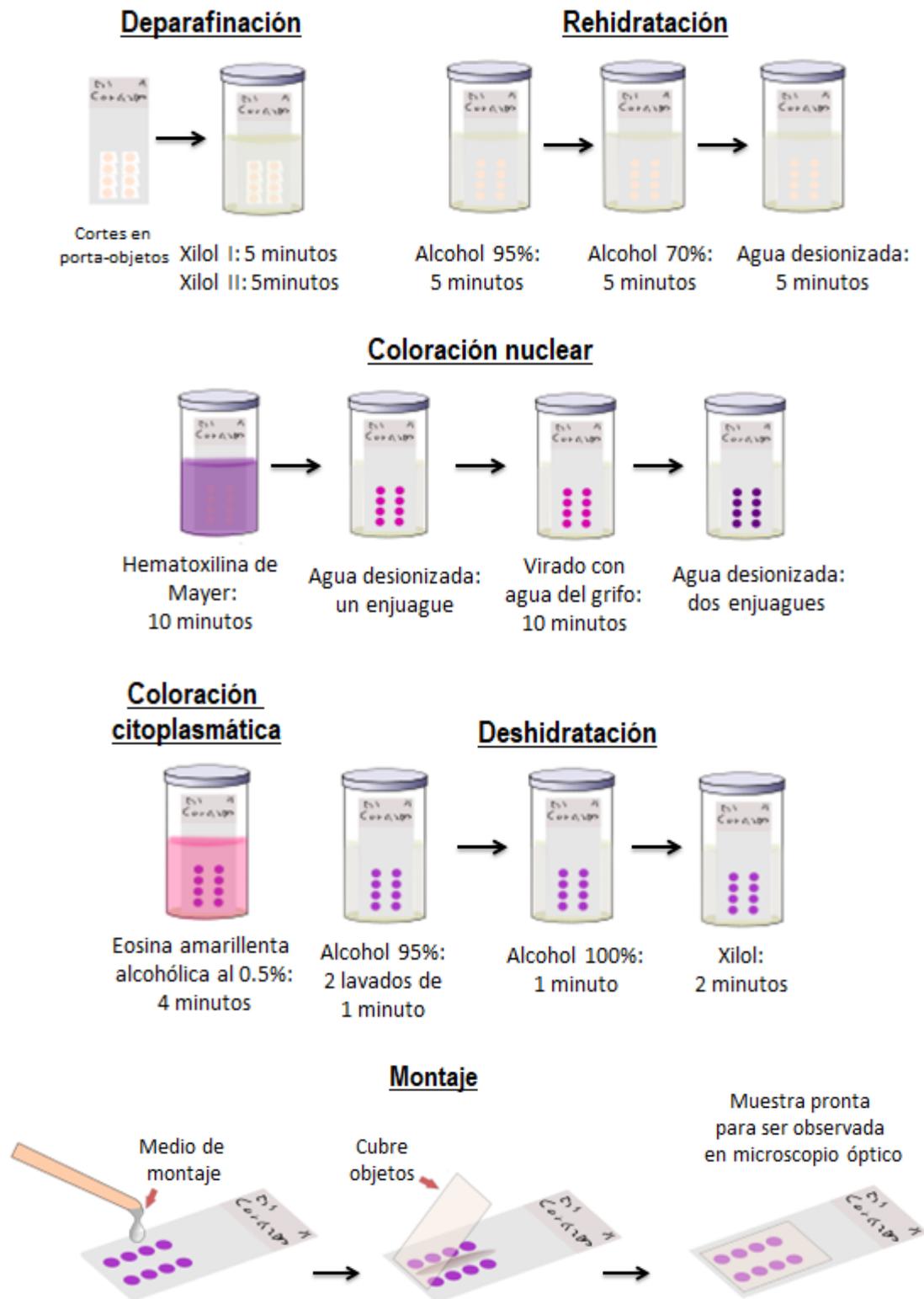


Figura 15 Esquema representativo de tinción típica de Hematoxilina-Eosina. Extraído y modificado de página web de *Atlas de histología vegetal y animal de la Universidad de Vigo, España*.

5. Resultados y discusión

5.1 Escalado de FNZ

El proceso de síntesis involucra dos pasos de reacción (Figura 16). En el primero de ellos se obtiene el intermedio de reacción **BFX** con un muy buen rendimiento, 85 %.

La síntesis a micro-escala¹⁴¹ del dióxido de fenazina logró escalarse, optimizándose y obteniéndose una masa de 3.6 g de producto deseado, correspondientes a un rendimiento del 56 %.

El compuesto de interés es obtenido por un proceso de expansión del heterociclo, por una reacción de Beirut¹⁴², del benzofuroxano con el anión fenolato en medio básico¹⁴³. Se utilizan 5 g del intermedio y se obtiene finalmente el dióxido de fenazina deseado con un rendimiento mayor, en comparación al rendimiento a micro-escala (50 %)¹⁴¹.

Cabe destacar que cuando se utilizan benzofuroxanos sustituidos las reacciones suelen dar una mezcla de isómeros de N^5, N^{10} -dióxidos de fenazina sustituida en las posiciones 7 y 8 a causa del tautomerismo del benzofuroxano de partida. La proporción isomérica depende del efecto electrónico del sustituyente.¹⁴³ Cuando se hace reaccionar 5-fluorobenzofuroxano con *p*-aminofenol el producto de la reacción rinde casi exclusivamente, según el análisis espectroscópico, al isómero N^5, N^{10} -dióxido de 2-amino-7-fluorofenazina.¹⁴⁴

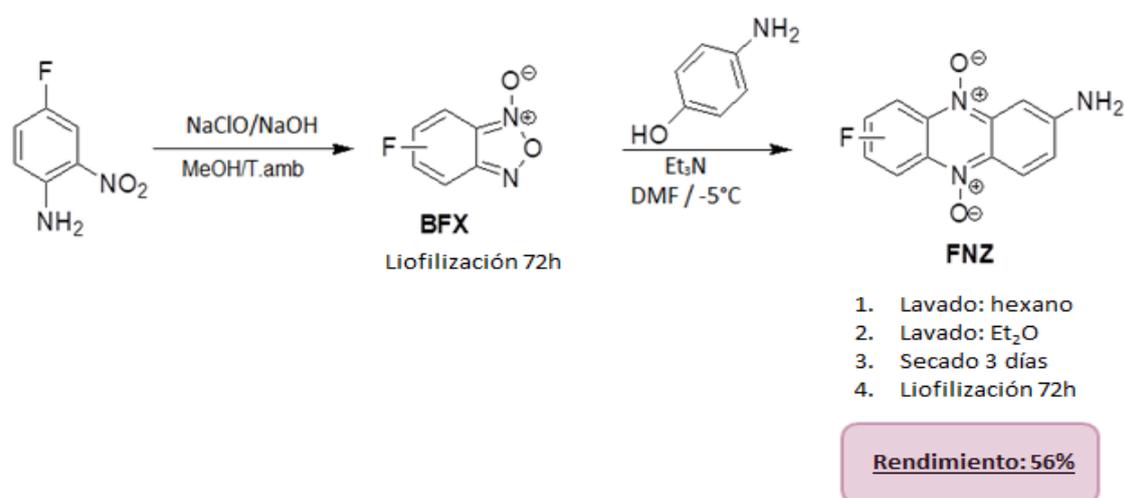


Figura 16 Procedimiento sintético para la obtención del dióxido de fenazina deseado. Sólido violeta oscuro. Se especifican los pasos adicionales a la síntesis originalmente descrita, que mejoraron su rendimiento.

Los pasos adicionales a la síntesis a micro-escala que ayudaron a la optimización, fueron principalmente 2 ciclos de liofilización de 72 horas cada uno, uno del intermedio y otro del producto final, realizados luego de cada reacción. Se obtiene así el producto pronto para su caracterización fisicoquímica.

Del espectro obtenido de ^1H RMN del compuesto de interés (Figura 17) se extrae la siguiente información:

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 8.52 (dd, $J = 9.6, 5.6$ Hz, 1H, Hd), 8.30 (d, $J = 9.4$ Hz, 1H, Hc), 8.17 (dd, $J = 9.5, 2.7$ Hz, 1H, Hf), 7.84 – 7.73 (m, 1H, He), 7.41 (dd, $J = 9.6, 2.3$ Hz, 1H, Hb), 7.36 (d, $J = 2.2$ Hz, 1H, Ha), 6.94 (s, 2H, NH_2).

En el espectro se observan las señales características de la molécula. Se pudo inferir que se trata efectivamente del compuesto de interés en su forma isomérica y además se pudo evidenciar la ausencia de disolventes residuales, lo cual estaría indicando que los procesos de liofilización fueron exitosos.

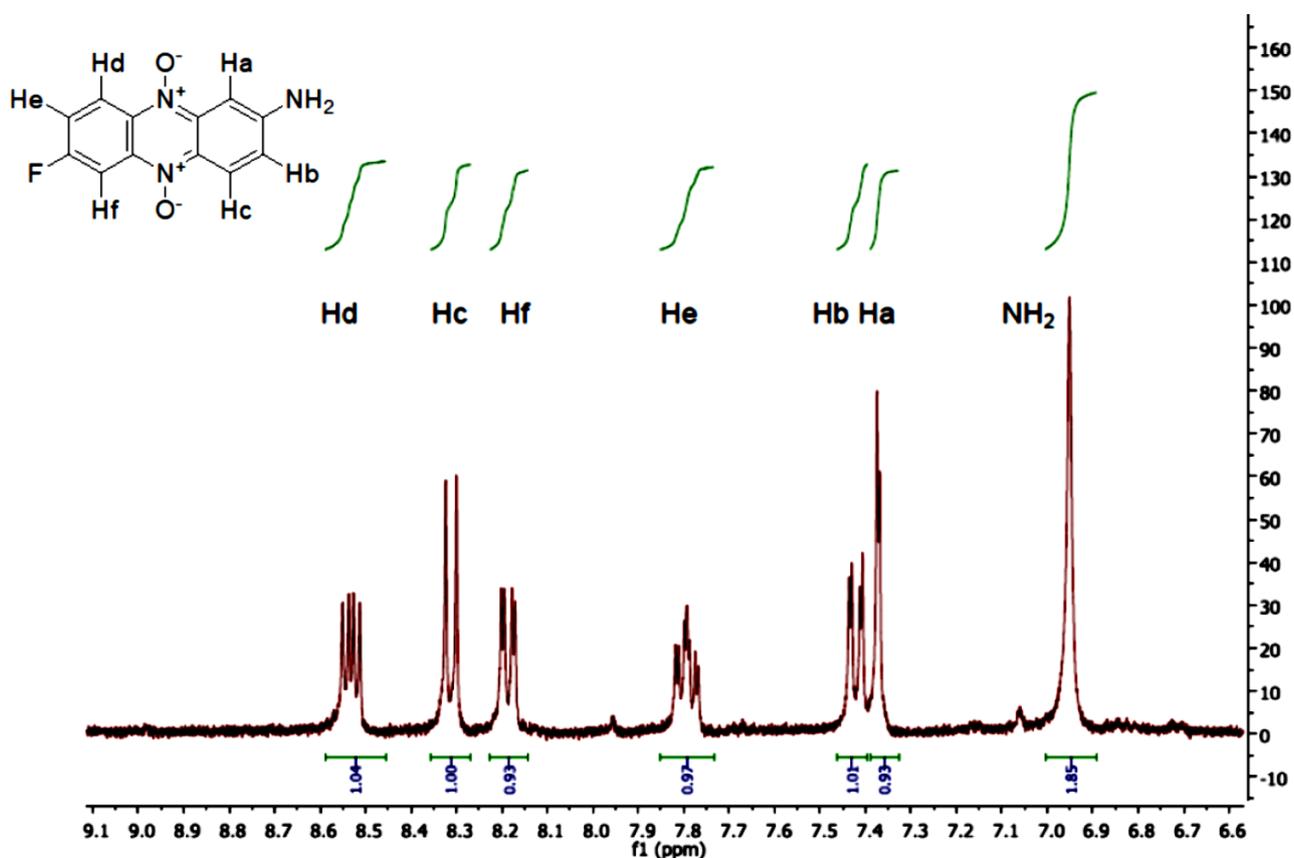


Figura 17 Espectro completo de ^1H RMN. En el eje X se representan los desplazamientos químicos, δ , en partes por millón (ppm) y en el eje Y la intensidad de la señal. Entre 6.6 y 9.1 ppm del producto obtenido FNZ en $\text{DMSO}-d_6$. Se representan los desplazamientos de los protones característicos de la molécula.

5.2 Vehiculización de FNZ y ensayos de toxicidad aguda en un modelo murino

Un gran número de formulaciones se han podido desarrollar gracias al avance tecnológico e industrial, sin embargo, más del 50 % de los fármacos presentan el inconveniente de ser

hidrofóbicos mostrando una baja solubilidad en disolventes acuosos.¹⁴⁵ Constituyendo esto un gran obstáculo a vencer para lograr una absorción y biodisponibilidad adecuadas.

Se ha demostrado que la vehiculización de fármacos reduce toxicidad, incrementa solubilidad y estabilidad, además de mejorar selectividad por el tejido o zona a tratar.¹⁴⁶

Dada la baja solubilidad que presentan los dióxidos de fenazina,^{117,147} en el presente trabajo se vehiculizó el compuesto en una dispersión con proporciones 4:1 (% v/v) de suero fisiológico: (Tween[®] 80), lo que permitió aumentar la solubilidad y mejorar la limitada biodisponibilidad que posee **FNZ**, como se verá en los resultados *in vivo*.

Estudios previos de toxicidad aguda¹⁴⁸ en ratones, permitieron determinar la dosis letal media o DL₅₀, la cual indica la concentración de compuesto para la cual se obtiene un 50% de muerte de los animales tratados. Así **FNZ** vehiculizada de esta forma, presenta una DL₅₀ superior a 2000 mg/kg de masa corporal de animal y el agente **FNZ** en suero fisiológico tiene una DL₅₀ de 1500 mg/kg de masa corporal del animal, demostrando claramente que la vehiculización del compuesto disminuye la toxicidad.¹⁴⁹

5.3 Estudio anti-tumoral *in vivo*

5.3.1 Caracterización de modelo tumoral

El ensayo se llevó a cabo en ratones de la cepa Balb/c de entre 6 y 8 semanas de edad portadores de tumor de mama, inducido por la línea celular 4T1, simulando estadio IV humano.¹²¹ Durante los 22 días que duró el experimento se realizaron medidas tanto del tamaño tumoral como de la masa de cada animal.

Como se mencionó en apartados anteriores se debe controlar el estado de bienestar del animal, para evitar su sufrimiento durante el ensayo. En este ensayo se destaca la presencia de un leve grado de pilo-erección, sobre los últimos 7 días de experimento, propia del estado de portador de tumor del animal. Las valoraciones del nivel de bienestar de los animales por el test de Irwin¹³⁰ fueron normales, la masa de los tumores no sobrepasó en ningún momento el 10% del peso del animal y la disminución de masa respecto del día 0 no superó el 10%.

En base a los datos obtenidos de tamaño tumoral en función de los días, se calcularon los volúmenes tumorales según la siguiente ecuación: $V=(d^2D)/2$, donde **d** es el diámetro menor y **D** es el diámetro mayor del tumor¹³² (Figura 18).

Los tamaños tumorales de todos los animales fueron promediados, obteniendo un valor representativo por día con su respectivo error. Se pudo observar que el crecimiento tumoral, con el avance de los días, se ajusta a una exponencial con coeficiente de determinación (R^2) de 0.97, (Figura 5.2). Alcanzando un valor de 1330.25 mm³ al día 22 post-inoculación.

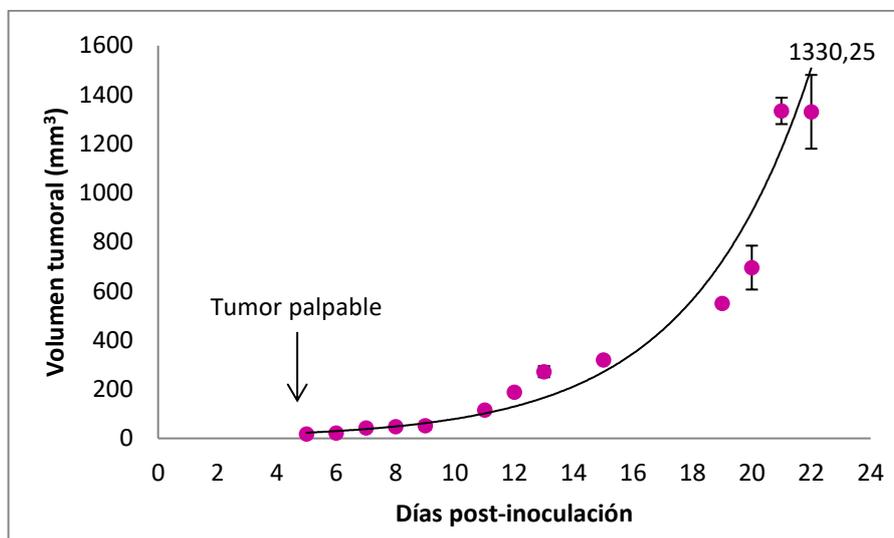


Figura 18 Caracterización de modelo tumoral. Gráfico de los volúmenes tumorales (en mm³) vs días post-inoculación, desde el día que el tumor comienza a ser palpable hasta el fin del experimento. Se usaron 7 animales.

5.3.2 Estudio anti-tumoral

La posología se determinó teniendo en cuenta resultados previos de toxicidad aguda en animales sanos¹⁴⁹, los cuales arrojaron los siguientes datos, ya citados:

- **SF:T/FNZ** presenta una DL₅₀ superior a **2000 mg/kg de masa corporal del animal**
- **FNZ disuelta en SF** presenta una DL₅₀ de **1500 mg/kg de masa corporal del animal**

En base a los mismos, la posología elegida fue aquella en la que se le entrega a cada animal tratado una dosis de 20 mg/kg de masa corporal de animal por día de administración, contenidos en un volumen de 185 µL, siguiendo el cronograma de la [tabla 1](#). El mismo volumen de disolución de SF:T fue administrado a los animales del grupo control. De esta manera se está 135 veces por debajo de la DL₅₀, por lo que, no habrá efectos tóxicos por parte de la formulación sobre el animal.

Tabla 1. Cronograma de ensayo planteado en el presente trabajo.

Días post-inoculación de células							
0	5	7	9	12	14	16	22
Inoculación de células	Tumor palpable. Inicia tratamiento. Dosis 1	Dosis 2	Dosis 3	Dosis 4	Dosis 5	Dosis 6	Fin del ensayo Extracción de sangre y necropsia

Volumen tumoral

El conocimiento científico de hoy en día está cada vez más basado en estudios empíricos, cuyos resultados son en general presentados y analizados usando métodos estadísticos. En el caso de este trabajo se seleccionó como método estadístico de test t-Student. Éste lo que hace es investigar si los valores que se tienen para dos grupos son iguales, asumiendo que los datos están normalmente distribuidos.¹⁵⁰ En muchos test estadísticos, t-Student no escapa del caso, se definen dos hipótesis, una de ellas H_0 o “hipótesis nula”. Además, un parámetro importante que se reporta es el p-valor.¹⁵¹ Este parámetro mide cuan fuerte es la evidencia contra H_0 , a menor valor de p, más fuerte es la evidencia contra dicha hipótesis.¹⁵² Es decir, para este caso la hipótesis nula es que **hay** diferencia entre los valores de los tamaños tumorales de los animales tratados y los controles.

Como se puede ver en la **figura 19**, los p-valor obtenidos desde el día 17 hasta el fin del ensayo son menores a 0.05. Cuando el parámetro p toma valores menores a 0.05, se habla de una “significancia” en los datos, indicativo de que el efecto que se está estudiando, diferencia en el volumen tumoral de los dos grupos, si existe.¹⁵¹

La **figura 18** también muestra que al día 22 post-inoculación de las células, el volumen promedio de los animales tratados es de 135.25 mm³ en comparación con el grupo control cuyo valor resultó de 54.1 mm³, es decir que hubo una reducción de 2.5 veces en el volumen tumoral.

Es así, que a través del método estadístico seleccionado y del análisis del grafico presentado se logran interpretar como el agente administrado a los animales tratados logra impedir el avance del crecimiento del tumor.

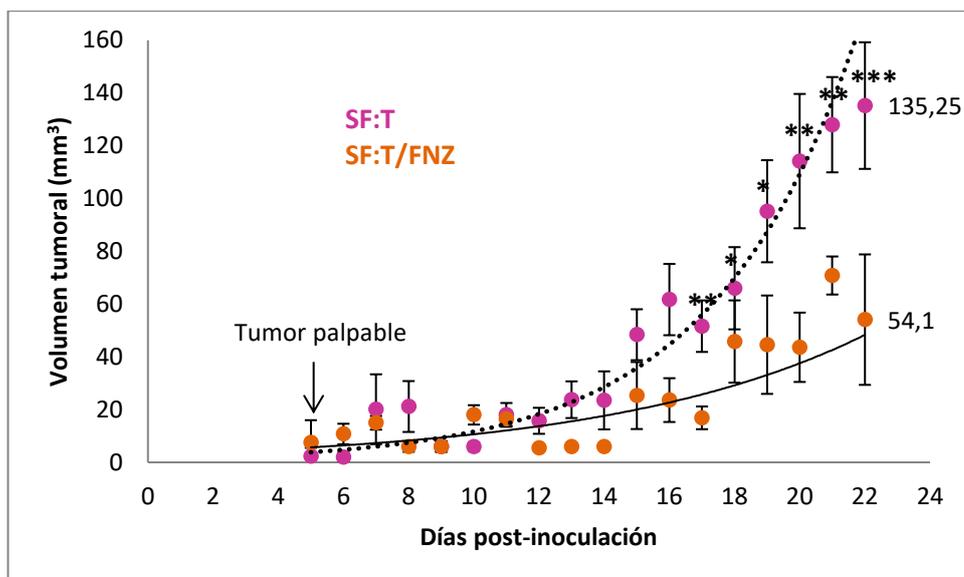


Figura 19 Evaluación del tamaño tumoral de los dos grupos de animales tratados. Se grafica volumen tumoral en función de días post-inoculación. Los asteriscos representan el p-valor obtenido aplicando el test t-Student. (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$). Los días de dosificación fueron: 5, 7, 9, 12, 14, 16. Se utilizaron 7 animales iniciales para cada caso.

Supervivencia

Además del seguimiento de los volúmenes tumorales, se realizó un seguimiento de la supervivencia de los animales a lo largo del ensayo (ver *curva de supervivencia* Figura 20).^{153,154}

Particularmente cuando se está trabajando con una enfermedad crónica como cáncer de mama, la supervivencia es medida como la probabilidad de permanecer vivo durante una determinada cantidad de tiempo. El cual puede ser definido como el tiempo de supervivencia: que es el tiempo transcurrido desde el acontecimiento de estudio o estado inicial hasta el estado final.¹⁵⁴

De manera de obtener datos adecuados para este análisis de supervivencia se definió:¹⁵⁴

- Origen o inicio de un seguimiento
- Escala de tiempo
- Evento

En el presente trabajo como inicio del seguimiento se toma el día de inoculación de las células tumorales, primer punto en el gráfico de la figura 20. La escala de tiempo fue definida en base a la duración del ensayo, desde la inoculación de las células hasta el día 22, cuando se da punto final al mismo. Por último, el evento “muerte” o “recidiva” se presentará en una única oportunidad, tratándose de una enfermedad como el cáncer.

Existen dos grandes métodos empleados para el análisis de supervivencia, Kaplan-Meier y el análisis actuarial de Cutler-Ederer.¹⁵⁵ El método utilizado en este trabajo fue el de Kaplan-Meier,^{156, 157} particularmente caracterizado por intervalos definidos por la ocurrencia del evento en individuos independientes en un tiempo t determinado. Asimismo, si se desea comparar dos curvas de supervivencia, la prueba no paramétrica de log-rank (o logaritmo-rango) es una de las más usadas y empleada en la presente tesis.¹⁵⁸

En investigaciones médicas se quiere, en general, comparar la supervivencia de dos grupos de individuos que difieren en cierto factor (edad, sexo, protocolo de tratamiento, tipo de tratamiento, entre otros) y el efecto que este factor tiene sobre la supervivencia es lo que se intenta conocer. Se caracteriza por ser especialmente útil en estudios con número pequeño de animales.¹⁵⁸

Una característica importante, es que al final del período de observación no todos los individuos de estudio habrán presentado el evento de interés,¹⁵⁸ pudiendo así, inferir algo sobre el tratamiento que se está realizando. El evento de interés en este trabajo es si los animales viven hasta el final del experimento en un 100 % luego del tratamiento con el potencial fármaco.

El resultado a destacar en este apartado es la diferencia en la supervivencia de los dos grupos de estudio: grupo tratado **SF:T/FNZ** y grupo control **SF:T**. La supervivencia de los animales control cae casi a un 50% (mediana de supervivencia) al día 19 y se mantiene así hasta finalizar el ensayo con la posología ya mencionada. En contrapartida, los animales tratados tienen dos bajas en la supervivencia, ninguna de ellas alcanzando el 50% y se mantiene superior a este valor hasta el final del experimento.

Esta información, complementaria con la obtenida en el estudio de volumen tumoral, estaría indicando que el tratamiento además de impedir el crecimiento del tamaño tumoral, estaría impactando directamente en un mayor porcentaje de sobrevida del grupo tratamiento. Hoy en día existen muchos medicamentos en la industria farmacéutica que fueron aprobados por el solo hecho de aumentar la sobrevida de las personas que padecen esta enfermedad.^{39, 159}

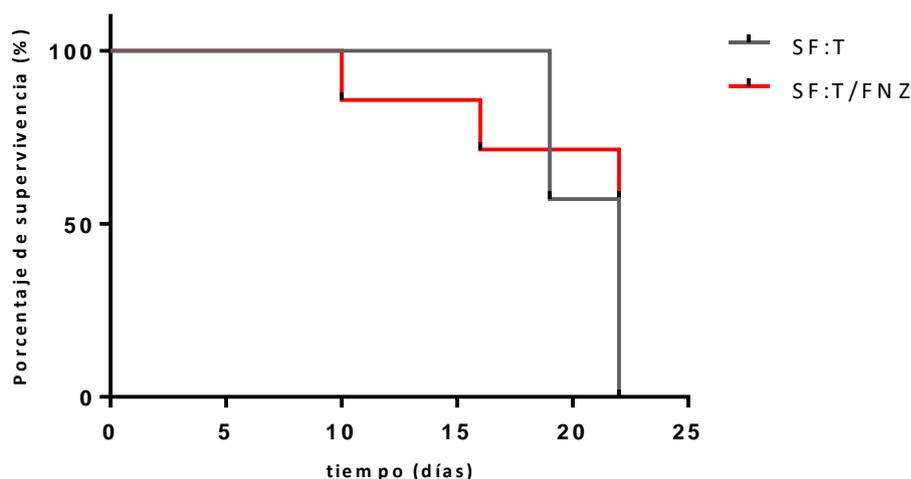


Figura 20 Curva de supervivencia. Animales tratados (SF:T/FNZ) vs Animales control (SF:T). El análisis comparativo de ambas curvas se llevó a cabo a partir del análisis de Kaplan-Meier con la prueba no paramétrica de log-rank de (P): 0.13, $X^2=2.31$.

5.3.3 Análisis clínicos

Los exámenes de laboratorio clínico son de gran utilidad para la confirmación o rechazo de una hipótesis, pronosticar la evolución de una enfermedad, monitorear la evolución de una enfermedad, entre otras cosas.¹⁶⁰

En oncología dos de los análisis más comunes son el bioquímico y el recuento sanguíneo completo. En el análisis bioquímico se hace un conteo de sustancias que son segregadas a la sangre como metabolitos, electrolitos, proteínas, enzimas, etc. En un recuento sanguíneo completo se miden las cantidades de los diferentes tipos de células que se encuentran en la sangre.³⁹

De los valores bioquímicos obtenidos (Tabla 3) se puede observar, por un lado, que la **creatinina** se encuentra por debajo, tanto para los animales tratados con el agente como para el grupo control, del valor medio descrito para animales sanos. Cabe destacar que la creatinina es un subproducto de la creatina que se encuentra en sangre y en músculo de vertebrados.^{161, 162, 163} En los análisis bioquímicos los niveles de creatinina brindan cierta información del funcionamiento de los riñones. En este caso los valores están levemente por debajo de lo reportado para animales sanos. Para conocer si hay realmente un daño renal se deberían hacer más pruebas. Además no se puede inferir con certeza si los valores obtenidos responden a la droga o al estado portador de tumores del animal, porque ambos valores son muy similares y porque los animales portadores pero no tratados (última columna) conservan el valor dentro del rango.

Otro parámetro a destacar son las enzimas hepáticas **aspartato aminotransferasa** (AST o GOT) y **alanina aminotransferasa** (ALT o GPT), que cuando se produce un daño en el hígado pueden filtrarse al plasma y verse incrementadas en el mismo, generando una alerta al respecto.^{164,165} Hay muchos fármacos que generan una alteración en los niveles de estas enzimas, produciendo lo que se conoce como hepatotoxicidad.^{166,167} Los valores observados en ambos grupos de animales para las dos enzimas se encuentran dentro del rango de la normalidad.

Tabla 2 Valores bioquímicos y hematológicos obtenidos luego de los tratamientos *in vivo*.

Parámetro	Unidades	SF:T	SF:T/FNZ	Animales sanos (sin tumor ni tratamiento)*	Animales CON tumor SIN tratamiento*
Glicemia	(g/L)	1.41	1.22	0.83 - 2.81	1.8
Urea	(g/L)	0.30	0.37	0.07-0.34	0.34
Creatinina	(mg/dL)	0.16	0.15	0.2-0.5	0.22
GPT	(UI/L)	28	70	40-170	36
GOT	(UI/L)	91	182	67-381	115
Hematocrito	%	26.8	42.6	42.1-67.0	42.2
Concentración de hemoglobina	g/dL	9.2	13.2	10.0-18.9	13.1
MCV(volumen corpuscular medio)	fL	47.2	52.3	48.0-64.1	49.3
MCH (Hemoglobina corpuscular media)	Pq	16.2	16.1	13.0-17.6	16.8
MCHC(Concentración de hemoglobina corpuscular media)	g/dL	34.3	30.8	23.9-33.1	34
Plaquetas	10 ³ cel/μL	680	816	476-1611	527
Leucocitos	10 ³ cel/μL	1.0	62.7	3.0-14.2	---
Neutrófilos	10 ³ cel/μL	0.0	1.2	0.74-3.01	1.8
Eosinófilos	10 ³ cel/μL	0.0	0.0	0.0-4.0	0.6
Basófilos	10 ³ cel/μL	0.0	0.0	0.00-0.16	0.00
Linfocitos	10 ³ cel/μL	0.4	61.2		
Monocitos	10 ³ cel/μL	0.0	0.1	0.34-1.37	0.0

*Página web Animal Lab: http://animalab.eu/sites/all/pliki/produkty-opobrania/balb_c_Mouse_clinical_pathology_data-pfd

Por tal motivo, no hay toxicidad generada por parte de la FNZ vehiculizada. El resultado obtenido se corresponde, además, con el planteamiento inicial en donde se describió la DL₅₀ de la formulación trabajada y en base a ello se estableció la dosis a administrar, más de 100 veces por debajo de dicha dosis.

Los resultados hematológicos también brindaron información prometedora. Analizando los valores de **hematocrito** se puede observar en la tabla 3 como el potencial pro-fármaco logra revertir los bajos niveles de hematocrito de los animales enfermos y sin tratamiento, llevándolo dentro del rango de los valores de referencia. Además que los valores de los animales tratados hayan sido revertidos por nuestro compuesto testeado es un gran hallazgo, ya que la anemia, enfermedad relacionada con este parámetro, afecta la calidad de vida de las personas que la padecen generando fatiga y debilidad entre otras cosas.³⁹

Otro parámetro hematológico a discutir son los **leucocitos** los cuales se encuentran en sangre y en tejidos linfáticos y son producidas por la médula ósea. Forman parte del sistema inmune, ayudando a combatir infecciones y otras enfermedades.³⁹ En este caso también se observa una reversión por parte de la droga, con la diferencia que la lleva a valores de leucocitos por encima del valor normal. Dicho incremento se considera normal ya que al aumentar la muerte celular, se reclutan más células inmunes para proteger el organismo.

5.4 Estudios post-mortem

5.4.1 Necropsia

A los 22 días post-inoculación de las células tumorales se realizó el sacrificio y posterior necropsia de los animales. Una vez realizadas las aperturas de las cavidades abdominal y torácica se hace una observación general en ambos grupos de animales del estado de los órganos, resultando en aspecto, color y tamaño normales, no presentando adherencias. La excepción a estas observaciones fueron el tumor y el bazo.

La masa promedio de los tumores de los animales tratados fue de 0.35 ± 0.16 g, mientras que para el grupo control sin tratamiento fue de 0.61 ± 0.12 g. Esta diferencia se traduce en 1.7 veces más pequeños para los animales tratados (Figura 21). Es así que el tratamiento administrado logra **enlentecer** el crecimiento del tumor, al mismo ritmo que el grupo control aumenta, como se observó en los estudios de seguimiento *in vivo*.

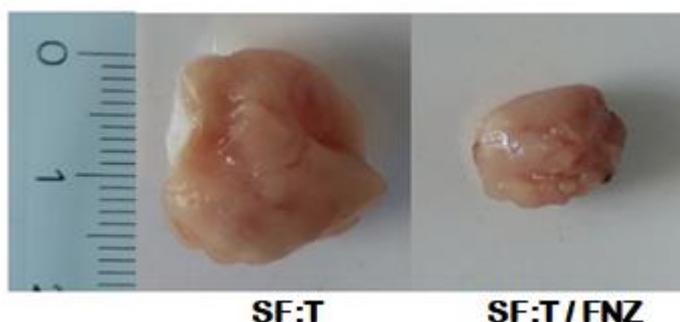


Figura 21 Tumor de animal tratado y control extraídos *post-mortem* al finalizar el ensayo

Por otro lado, el bazo logró mantenerse en su tamaño normal en los animales tratados, generándose un aumento del mismo en el grupo control de 4.9 veces, registrando una masa promedio de 0.36 ± 0.06 g para los controles y de 0.073 ± 0.039 g para los tratados (Figura 22). Dicho fenómeno de incremento en el tamaño del bazo se denomina esplenomegalia.^{168,169, 170} Puede producirse por metástasis de carcinomas de pulmón o de mama o por melanomas,^{171,172} y es característico del modelo tumoral en estudio.^{173, 174}

Además, como consecuencia de la enfermedad se descompensan muchos mecanismos fisiológicos, bioquímicos y de defensa que pueden haber llevado a que se desarrolle esplenomegalia.



Figura 22 Bazos extraídos *post-mortem* de animales tratados con el fármaco y control al finalizar el protocolo de tratamiento.

5.4.2 Anatomía patológica

Del protocolo descrito en el apartado 4.5.2 *Preparación de cortes histológicos*, se pudieron obtener las imágenes de la figura 23. A la izquierda de la misma se intentan ver las diferentes zonas del tumor sólido, confirmando la hipoxia tumoral,¹⁷⁵ referenciado en la figura 23 con

una la flecha que va desde la zona con menor hipoxia a la de mayor hipoxia. En la **figura 23** a la derecha se observan los acinos característicos de glándulas de secreción externa.

El proceso de necrosis en células tumorales producido por hipoxia, involucra que la célula se agrande, su membrana plasmática se rompa y se genere un colapso que termina en la lisis celular.¹⁷⁶ Esto último genera que elementos internos de la célula queden ahora expuestos a la tinción que se utilizó en la preparación de los cortes histológicos.

La tinción de hematoxilina- eosina se usa hace muchos años para el reconocimiento de diferentes tipos de tejidos. La hematoxilina es un colorante básico que tiñe estructuras ácidas principalmente el núcleo, ya que es rico en ácidos nucleicos, de color azul/violeta. Por el contrario, la eosina es un colorante ácido que tiñe estructuras básicas como organelos citoplasmáticos, de color rosa.¹⁷⁷

La zona hipóxica como se mencionó anteriormente, está vinculada con la zona necrótica. En la **figura 23** se puede observar una gran densidad de color violeta correspondiente a la hematoxilina, por ende la zona de necrosis. Los cortes histológicos de este tipo deben tener un espesor de aproximadamente entre 3-5 μ m para ver con mayor resolución los detalles de la muestra,^{178, 179, 180} como por ejemplo el grado de empaquetamiento de las células tumorales, su distribución, tamaño del núcleo y nucleolo o los cambios morfológicos que éstos experimentan.¹⁸¹ Si bien la muestra de la **figura 23** no tiene el espesor necesario, la tinción permite diferenciar gradualmente la hipoxia característica de este tipo de tumores.

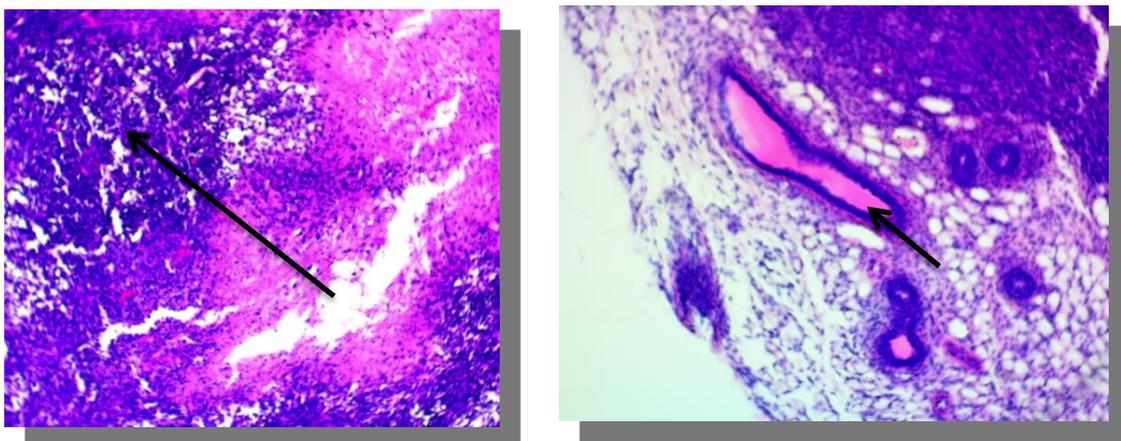


Figura 23 Fotografía de preparaciones histológicas de tumor sólido de cáncer de mama murino. El espesor del corte es de 20 μ m. Aumento 10x.

6. Conclusiones

Se realizó la síntesis a mayor escala de **FNZ**, mejorando su rendimiento.

Se estudió la capacidad anti-tumoral *in vivo* de **FNZ** vehiculizada, impidiendo la misma que el volumen tumoral avance al mismo ritmo que el grupo control.

Dichos resultados fueron apoyados por análisis clínicos y estudios de necropsia.

7. Perspectivas

De manera de ahondar más en el trabajo aquí presentado se considera:

- Realizar una puesta a punto del procesamiento de órganos para histopatología y continuar con el análisis de los órganos extirpados.
- Profundizar en detalle en los protocolos farmacológicos.
- Realizar ensayos de farmacocinética y farmacodinamia.
- Investigar las diferentes metodologías para la detección, grado de hipoxia tumoral y metástasis y aplicarlas.

8. Bibliografía

1. Página web Organización Mundial de la Salud: <https://www.who.int/cancer/es/>. Visitado: noviembre, 2018.
2. Pelengaris, S. Khan, M. “*The Molecular Biology of Cancer*” 2º Edición. John Wiley & Sons. Oxford, UK. (2013)
3. International Agency for research on cancer. “*World Cancer Factsheet*”. Cancer research UK, WHO. (2014)
4. Registro Nacional del Cáncer. Comisión Honoraria de Lucha Contra el Cáncer (CHLCC). “Situación epidemiológica del Uruguay en relación al Cáncer”. Informe META. (2018)
5. J. Chamberlain, D. Coleman, R. Ellman, S. M. Moss Edinburgh, A. P. M. Forrest, M. M. Roberts, F. E. Alexander, T. J. Anderson, A. E. Kirkpatrick; Guildford, B. A. Thomas, J. L. Price, N. Gibbs, P. S. Boulter, P. Pocock; Huddersfield, G. First results on mortality reduction in the UK of early detection of breast cancer. *The Lancet*. 332(8608), 411-416, (1988)
6. Dr. A. Marilyn Leitch MD Dr. Gerald D. Dodd MD Dr. Mary Costanza MD Dr. Michael Linver MD Dr. Peter Pressman MD Dr. LaMar McGinnis MD Dr. Robert A. Smith PhD American Cancer Society guidelines for the early detection of breast cancer: Update 1997. *A cancer journal for clinicians*. 47(3), 150-153. (2008)
7. Alberts. B, Johnson. A, Lewis. J, Raff. M, Roberts. K, Walter. P. “*Biología Molecular de la Célula*”. Omega S.A, Barcelona, España, (2004).
8. Pan, M. Chiou, Y. Wang, Y. Ho, C. Lin, J. “*Multistage carcinogenesis process as molecular targets in cancer chemoprevention by epicatechin-3-galleate*”. *Food & Function*, 2, 101.-110 (2011)
9. Hosick, H. Rizzo, C. Campanella, J. Alder, R. “*Cancer*”. Magill’s Medical Guide (edición en línea). (2019)
10. De la Torre, C. “*Aceleración y frenado de la proliferación celular*” *Anales de las Real Academia Nacional de Farmacia*, 71, 535-569, (2005)
11. Arthur B. Pardee, Gary S. Stein. “*The Biology and Treatment Of Cancer, Understanding Cancer*”. Wiley-Blackwell. Hoboken, New Jersey. (2009)
12. Muñoz, A. “*Cáncer: genes y nuevas terapias*”. Editorial, Hélice. Madrid, España. (1997)
13. Peralta, R. Valdivia, A. Mendoza, M. et al. “*Los genes del cáncer*” *Revista Médica del Instituto Mexicano de Seguro Social*, 53, 178-187, (2015).
14. Curtis, H. “*Chemical and Physical Carcinogenesis: Advances and Perspectives for the 1990s*”. *Cancer Research*. Vol 51. 5023-5044 (1991)
15. Dominguez, L. “*Principios generales de carcinogenesis: Carcinogénesis química y hormonal*” *Biocáncer*, 1, 2-4, (2004)
16. Beremblum, I. Shubik, P. “*A new, quantitative, approach to the study of the stages of chemical carcinogenesis in the mouses’s skin*” *British Journal of Cancer*
17. De Moreno, M. Silvia, C. Cardinales, M. Coromina, E. “*Fases de la Carcinogénesis química. Actualización*” *FOUNT*, 34, 18-22, (2016)
18. King, M. “*Metastasis*”. Salem Press Encyclopedia of Health. (2017)
19. García, M. “*Long non-coding RNAs (lnc RNAs) y cancer*” Universidad Autónoma de Barcelona. (2014)
20. Perini, S. Silla, L. Andrade, F. “*A telomerase em células tronco- hematopoéticas*” *Revista Brasileira de Hematología E Hemoterapia*, 30(1), 47-53, (2008)
21. Messagué, J. “*Evolución y metástasis del Cáncer*” *SEBBM*, 160, 22-25, (2009)

22. Página web Instituto Nacional del Cáncer: <https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionario/def/tumor-solido>. Visitado diciembre, 2018
23. Página web *American Cancer Society*: <https://www.cancer.org/es/>. Visitado: enero, 2019
24. Sommer, S. Fuqua, S. Estrogen receptor and breast cancer. *Seminars in cancer biology*. 11-(5) 339-352, (2001)
25. Hisham Mohammed, I. Alasdair Russell, Rory Stark, Oscar M. Rueda, Theresa E. Hickey, Gerard A. Tarulli, Aurelien A. Serandour, Stephen N. Birrell, Alejandra Bruna, Amel Saadi, Suraj Menon, James Hadfield, Michelle Pugh, Ganesh V. Raj, Gordon D. Brown, Clive D'Santos, Jessica L. L. Robinson, Grace Silva, Rosalind Launchbury, Progesterone receptor modulates ERalpha action in breast cancer. *Nature*, 523, 313-317, (2015)
26. Página web Breast Cancer: <https://www.breastcancer.org/>. Visitado: enero, 2019
27. Brown, J.M. "Exploiting the hypoxic cancer cell: mechanisms and therapeutic strategies". *Molecular Medicine Today*, 6, 157-161, (2000)
28. Pio, R. "Tumores sólidos" CIMA, Universidad de Navarra, (2018)
29. Gurusamy, D. Clever, D. Eil, R. Restifo, N. "Novel "Elements" of Immune Suppression within the Tumor Microenvironment" *Cancer Immunology Research*, 5(6), 426-433, (2017)
30. Brown, J. "The Hypoxic Cell: A Target for Selective Cancer Therapy –Eighteenth Bruce F. Cain Memorial Award Lecture" *Cancer Research*, 59, 5863-5870, (1999)
31. Brown, J. Giaccia, A. "The Unique Physiology of Solid Tumors: Opportunities (and Problems) for Cancer Therapy" *Cancer Research*, 58, 1408-1416, (1998)
32. Fernández, M. "Hipoxia: una diana terapéutica" *Clinical and Translational Oncology*, 7, 475-476, (2005)
33. Kizaka-Kondoh, S. Tanaka, S. Harada, H. Hiraoka, M. "The HIF-1-active microenvironment: An environmental target for cancer therapy" *Advanced Drug Delivery Reviews*, 61, 623-632. (2009)
34. Wouters, B. Beucken, T. Magagnin, M. Lambin, P. Koumenis, C. "Targeting hypoxia tolerance in cancer" *Drug Resistance Updates*, 7, 25-40, (2004)
35. Gatenby, R. Gillies, R. "Why do cancer have high aerobic glycolysis?" *Nature Reviews Cancer*, 4, 891-899. (2004)
36. Brown, J.M. "Tumor microenvironment and the response to Anticancer Therapy" *Cancer Biology & Therapy*, 1(5), 453-458, (2002)
37. Boticario, C. Cascales, M. "Hipoxia y Cáncer". *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia*, 73(3), 379-408, (2010)
38. DeVita, V. Lawrence, T. Rosenberg, S. "Cancer. Principles & Practice of Oncology" 10^o Edición. Wolters Kluwer Health. EEUU, (2015)
39. Folkman, J. "What Is the Evidence That Tumors Are Angiogenesis Dependent?" *Journal of the National Cancer Institute*, 82, 4-7, (1990)
40. Greco, O. Marples, B. Joiner, M. Scott, S. "How to Overcome (and Exploit) Tumor Hypoxia for Targeted Gene Therapy". *Journal of Cellular Physiology*, 197, 312-325, (2003)
41. Liao, D. Johnson, R. "Hypoxia: A key regulator of angiogenesis in cancer" *Cancer and Metastasis Reviews*, 26(2), 281-290, (2007)
42. Krock, B. Skuli, N. Celeste, M. "Hypoxia – Induced Angiogenesis: Good and Evil" *Genes & Cancer*, 2(12), 1117-1133, (2011)
43. Carmeliet, P. Join, R. "Angiogenesis in cancer and other diseases". *Nature*, 407, 249-257., (2000)
44. Shen, C. Nettleton, D. Jiang, M. Kim, S. Powell, J. "Roles of the HIF-1 Hypoxia-inducible Factor during Hypoxia Response in *Caenorhabditis elegans*" *Journal of Biological Chemistry*, 280(21), 20580-20588, (2005)

45. Pascal, J. Mottet, D. Raes, M. Michiels, C. "CoCl₂, a Chemical Inducer of Hypoxia-Inducible Factor-1, and Hypoxia Reduce Apoptotic Cell Death in Hepatoma Cell Line Hep62" *Annals New York Academy of Science*, 973, 443-447, (2002)
46. Roval, R. Lau, K. Tran, M. Sowter, H. Mandriota, S. Ratcliffe, P. "Contrasting properties of Hypoxia-Inducible Factor – 1 (HIF-1) and HIF-2 in Von Hippel-Lindau- Associated Renal Cell Carcinoma" *Molecular and Cellular Biology*, 25(13), 5675-5686, (2005)
47. Greijer, A. Van der Wall, E. "The role of Hypoxia inducible factor -1 (HIF-1) in hypoxia induced apoptosis" *Journal of Clinical Pathology*, 57(10), 1009-1014, (2004)
48. Won, J. Lee, J. Bae, S. Jeong, J. Kim, S. Kim, K. "Hypoxia –Inducible factor (HIF-1) α : it's protein stability and biological functions" *Experimental and Molecular Medicine*, 36(1), 1-12, (2004)
49. Laughner, E. Taghavi, P. Chiles, K. Mahan, P. Semenza, G. "HER2 (neu) Signaling Increases The Rate of Hypoxia-Inducible Factor 1 (HIF-1) Synthesis: Novel Mechanism for HIF-1-Mediated Vascular Endothelial Growth Factor Expression" *Molecular and Cellular Biology*, 21(12), 3995-4004, (2001)
50. Semenza, G. "Signal transduction to hypoxia-inducible factor 1" *Biochemical Pharmacology*, 64(5-6), 993-998, (2002)
51. Semenza, G. "Hydroxylation of HIF-1: Oxygen Sensing at the Molecular Level" *Physiology*, 19, 176-182, (2004)
52. Caramelo, C. Peña, J. Castilla, A. "Respuesta a la hipoxia. Un mecanismo sistémico basado en el control de la expresión génica" *Medicina*, 66(2), 155-164, (2006)
53. Petrova, V. Annicchiarico, M. Melino, G. Amelio, I. "The hypoxic tumor microenvironment" *Oncogenesis*, 7(10), 1-10, (2018)
54. Foxler, D. Bridge, K. James, V. "The LIMD1 protein bridges an association between the prolyl hydroxylases and VHL to repress HIF-1 activity" *Nature Cell Biology*, 14(2), 201-208, (2012)
55. Fraga, A. Ribeiro, R. Medeiros, R. "Hipoxia tumoral. Papel del factor inducible por hipoxia" *Actas Urológicas Españolas*, 33(9), 941-951, (2009)
56. Mabeesh, N. Amir, S. "Hypoxia-Inducible Factor (HIF) in human tumorigenesis" *Histology and Histopathology*, 22, 559-572, (2007)
57. Cepeda, K. Langer, M. Mosquera, A. Mosqueira, A. Montoya, C. Riveros, P. Mendoza, A. Cruz, J. Calderón, J. Aponte, M. Patiño, D. Velandia, L. Quintero, P. Ondo, A. "Radioresistencia en glioblastoma: papel de la hipoxia en la genotoxicidad tumoral" *CIMEL*, 23, 19-26 (2018)
58. Barboza, R. Alvéz, R. "Agentes antineoplásicos biorredutivos una nova alternativa para o tratamento de tumores sólidos" *Quimica Nova*, 25, 976-984, (2002)
59. Lin, A. Cosby, L. Shansky, C. Sartorelli, A. "Potential bioreductive alkylating agents. 1. Benzoquinone derivatives" *Journal of Medicinal Chemistry*, 15, 1247-1252, (1972)
60. Cerecetto, H. González, M. Lavaggi, M.L. "Development of Hypoxia Selective Cytotoxins for Cancer Treatment: An Update" *Medicinal Chemistry*, 2, 315-327, (2006)
61. Yue Sun, Z. Botros, E. Duen Su, A. "Sulfoxide- Containing Aromatic Nitrogen Mustards as Hypoxia- Directed Bioreductive Cytotoxins" *Journal of Medical Chemistry*, 43(22), 4160-4168, (2000)
62. Yo-Chin, J. Lians-Lu, G. Stevenson, R. "Cross-Bridged Cyclen of Cyctam Co(III) Complexes Containing Cytotoxic Ligands as Hypoxia-Activated Prodrugs" *Inorganic Chemistry*, 52(13), 7688-7698, (2013)
63. McKeown, S.R. Cowen, R.L, Williams, K.J. "Bioreductive Drugs: from Concept to Clinic" *Clinical Oncology*, 19, 427-442, (2007)
64. Philips, R.M. "Prospects for bioreductive drug development" *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 7(5), 905-928, (1998)

65. Guise, C. Mowday, A. Ashoorzadeh, A. Yuan, R. Lin, W. Wu, D. Smail, J. Patterson, A. Ding, K. *"Bioreductive prodrugs as cancer therapeutics: targeting tumor hypoxia"*. Chinese Journal of Cancer, 33, 80-88, (2014)
66. Jaffar, M. Stratford, I. *"Bioreductive drugs: selectivity towards hypoxic tissue"* Expert Opinion on the Therapeutic Patents, 9(10), 1371-1380, (1999)
67. Spanswick, V. Cummings, J. Smyth, J. *"Current issues in the Enzymology of Mitomicin C Metabolic Activation"* General Pharmacology, 31, 530-544, (1998)
68. Phillips, R. Hendricks, H. Peters, G. *"E09 (Apaziquone): from the Clinic to the laboratory and back again"* British Journal of Pharmacology, 168, 11-18, (2013)
69. Keyes, S. Rockwell, S. Sartorelli, A. *"Porfiromycins as a Bioreductive Alkylating Agent With Selective Toxicity to Hypoxic EMT6 Tumor Cells in vivo and in vitro"* Cancer Research, 45, 3642-3645, (1985)
70. Haffty, B. Son, Y. Wilson, L. Papac, R. Fischer, D. Rockwell, S. Sartorelli, A. Ross, D. Sasaki, C. Fischer, J. *"Bioreductive Alkylating AGENT Porfiromycin in Combination with Radiation Therapy for the Management of Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck"* Radiation Oncology Investigations, 5, 235-245, (1947)
71. Coles, S. Stratford, I. Fielden, E. Adams, G. Leopold, D. Elliot, D. Suto, D. Sebolt-Leopold, D. *"Dual function nitroimidazoles less toxic than RSU 1069: selection of candidate drugs for clinical trial (RB 6145 and / or PD 130908)"* International Journal of Radiation, 22(3), 545-548, (1992)
72. Dische, S. Saunders, M. Flockhart, I. Lee, M.. *"Misonidazole – A drug for trial in radiotherapy and oncology"* International Journal of Radiation, 5(6), 851-860 (1979)
73. Stratford, I. O'Neill, P. Sheldon, P. Andrew, R. Walling, J. Adams, G. *"RSU 1069, a nitroimidazole containing an aziridine grup: Bioreduction greatly increases cytotoxicity under hypoxic conditions"* Biochemical Pharmacology, 35(1), 105-109, (1986)
74. Papadopoulou, M. Ji, M. Rao, M. Bloomer, W. *"Reductive Metabolism of the Nitroimidazole-Based Hypoxia-Selective NLCQ-1 (NSC 709257)"*. Oncology Research, 14, 21-29, (2003)
75. Albertella, M. Loadman, P. Jones, P. Philips, R. Rampling, R. Burnet, N. Alcock, C. Anthoney, A. Viaters, E. Dunk, C. Harris, P. Wong, A. Lalanj, A. Twelves, C. *"Hypoxia-Selective Targeting by the Bioreductive Prodrug AQ4N in Patients with Solid Tumors: Results of a Phase I Study"* Cancer Therapy: Clinical, 14(4), 1096-1104, (2008)
76. McKeown, S. Hejmadi, M. McIntyre, I. McAleer, J. Patterson, L. *"AQ4N: an alkylaminoanthraquinone N-oxide showing bioreductive potencial and interaction with radiation in vivo"* British Journal of Cancer, 72, 76-81, (1995).
77. Brown, J.M. *"SR 4233 (Tirapazamine): a new anticancer drug exploiting hypoxia in solid tumors"* British Journal of Cancer, 67, 1163-1170, (1993)
78. Chinje, E. Cowen, R. Feng, J. Sharma, S. Wind, N. Stratford, I. *"Non-Nuclear Localized Human NOSII Enhances the Bioactivation and Toxicity of Tirapazamine (SR 4233) in Vitro"*. Molecular Pharmacology., 63, 1248-1255, (2003)
79. Reddy, S. Williamson, S. *"Tirapazamine: a novel agent targeting hypoxic tumor cells"* Expert Opinion on Investigational Drugs, 18, 77-87, (2009)
80. Tomczyk, M. Walczak, K. *"1,8-Naphthalimide based DNA intercalators and anticancer agents. A systematic review from 2007 to 2017"* European Journal of Medicinal Chemistry, 5(159), 393-422, (2018)
81. Lerman, L. S. *"Structural Considerations in the Interaction of DNA and Acridines"*. Journal of Molecular Biology, 3, 18-30, (1961)
82. Ibrahim, M. Taghour, M. Metwaly, A. Belel, A. Mehany, A. Elhendawy, M. Radwan, M. Yassin, A. El-Deeb, N. Hafez, E. ElSohly, M. Eissa, I. *"Design, synthesis, molecular modeling and anti-proliferative evaluation of novel quinoxaline derivatives as potential DNA intercalators and topoisomerase II inhibitors"* European Journal of Medicinal Chemistry, 15(155), 117-134, (2018)

83. Palchadhuri, R. Hergenrother, P. "DNA as a target for anticancer compounds: methods to determine the mode of binding and the mechanism of action". *Current opinion in biotechnology*, 18, 497-503, (2007)
84. Martínez, R. Chacón-García, L. "The search of DNA-Intercalators as Antitumoral Drugs: What it work and what did not work" *Current Medicinal Chemistry*, 12, 127-151, (2005)
85. Rescifina, A. Chiacchio, U. Corsaro, A. "Isoxazolidinyl polycyclic aromatic hydrocarbons as DNA- intercalating antitumoral agents". *European Journal of Medicinal Chemistry*, 46, 129-136, (2011)
86. Lorente, A. Fernández, M.J. "Interacciones no covalentes con el ADN". *Anales de la Real Sociedad Española de Química*, 104(4), 280-289, (2008)
87. Rescifina, A. Zagni, C. Varrica, M.G. "Recent advances in small organicmolecules as DNA intercalating agents: Synthesis, activity, and modeling". *European Journal of Medicinal Chemistry*, 79, 95-115, (2014)
88. Li, N. Ma, Y. Yang, C. "Interaction of anticancer drug mitoxantrone with DNA analyzed by electrochemical and spectroscopic methods". *Biophysical Chemistry*, 16, 199-205, (2005)
89. Primeau, A. Rendon, A. Hedley, D. "The Distribution of the Anticancer Drug Doxorubicin in Relation to Blood Vessels in Solid Tumors" *Clinical Cancer Research*, 11(24), 8782-8788, (2005)
90. Denny, W. Atwell, G. Baguley, B. " "Minimal" DNA-Intercalating agents as anti-tumour drugs: 2-styrylquinoline analogues of amsacrine". *Anticancer Drug Design*, 2, 263-270, (1987)
91. Cerecetto, H. González, M. Labaggi, M.L. "Phenazine 5,10-dioxide derivatives as hypoxic selective cytotoxins" *Journal of Medicinal Chemistry*, 48, 21-25, (2005)
92. Página web de MSD salud: <https://www.msdsalud.es/recursos-salud/guias-para-pacientes/proceso-investigacion-desarrollo-aprobacion-farmaco.html> Visitado: julio 2019
93. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Centro de Investigaciones en Ciencias Veterinarias "Guía para cuidado y uso de animales de experimentación" Buenos Aires, Argentina
94. Hernández, S. "El modelo animal en las investigaciones biomédicas" *Biomedicina*, 2(3), 252-256, (2006)
95. Fernández. M. "Utilización de modelos animales en investigación del cáncer" Laboratorio de Experimentación Animal (LEA), Centro de Investigaciones Nucleares (CIN), Facultad de Ciencias (UdelaR). Unidad de Reactivos y Biomodelos de Experimentación (URBE), Facultad de Medicina (UdelaR). *Salud militar*, 31, (2012).
96. Página web Comisión Nacional de Experimentación Animal: www.cnea.gub.uy. Visitado: julio 2019
97. Página web Ministerio de Educación y Cultura: <https://www.mec.gub.uy/innovaportal/v/5387/2/mec/comision-nacional-de-experimentacion-animal>. Visitado: julio 2019
98. Página web Comisión Honorario de Experimentación Animal: www.chea.edu.uy Visitado: julio 2019
99. Silva. S. "Criterios de selección para animales de laboratorio: una guía práctica para investigadores" *Revista de Sanidad Militar México*, 56 (1), 46-52, (2002).
100. Benavides. F, Guénet. JL. "Manual de genética de roedores de laboratorio" Capítulo III. Universidad de Alcalá de Henares y SECAL. (2003)
101. Hedrich, H. Bullock, G. "The Laboratory Mouse" Elsevier, California, EE.UU. 2004
102. Benavides. F, Guénet. JL. "Modelos murinos en enfermedades humanas" *Medicina*, 61. 215-231, (2000)
103. Suckow, M. Danneman, P. "The Laboratory Mouse" New York, EE.UU. 2001
104. Saunders, M.P. Patterson, A.V. Chinje, E.C. "NADPH: cytochrome c (P450) reductaseactivates tirapazamina (SR4233) to restore de hypoxic and oxic cytotoxicity in

- an aerobic resistant derivate of the A549 lung cancer cell line*". British Journal of Cancer, 82(3), 651-656, (2000)
- 105.** Denny, W. "*Acridine Derivatives as chemotherapeutic Agents*" Current Medicinal Chemistry, 9(18), 1655-1665, (2002)
 - 106.** Cerecetto, H. González, M. Risso, M. Seoane, M. López, A. Expeleta, O. Mongue, A. Suescum, L. Mombrú, A. Bruno, A. "*Synthesis and biological evaluation of 1,2,5-oxadiazole N-oxide derivatives as potential hypoxic cytotoxins and DNA-binders*". Archive der Pharmazie, 333, 387-393, (2000)
 - 107.** Cerecetto, H. González, M. Onetto, S. Risso, M. Saenz, P. Seoane, G. Bruno, A. Alarcón, J. Olea-Azar, C. Expeleta, O. Mongue, A. "*1,2,4-Triazine N-oxide and di-N-oxide derivatives. Synthesis and evaluation as hypoxia selective cytotoxins*". Medicinal Chemistry Research, 10, 328-337, (2001)
 - 108.** Boinani, M. Cerecetto, H. González, M. Risso, M. Olea-Azar, C. Elpiro, O. Castellano, E. López, A. Expeleta, O. Mongue, A. "*1,2,5-oxadiazole N-oxide derivatives as potential anti-cancer agents: Synthesis and biological evaluation. Part IV*" European Journal of Medicinal Chemistry, 36, 771-782, (2001)
 - 109.** Cerecetto, H. González, M. Onetto, S. Saenz, P. Expeleta, O. Ceráom, A. MONGUE, A. "*1,2,4-Triazine N-oxide derivatives: Studies as potential hypoxic cytotoxins. Part II*" Archive der Pharmazie, 337, 247-258, (2004)
 - 110.** Cerecetto, H. González, M. Risso, M. Saenz, P. Olea-Azar, C. Bruno, A. Azqueta, A. De Cerpain, A. Mongue, A. "*1,2,4-Triazine N-oxide derivatives: Studies as potential hypoxic cytotoxins. Part III*" Archive der Pharmazie, 337, 271-280, (2004)
 - 111.** Torre, M. Gambino, D. Araujo, J. Cerecetto, H. González, M. Lacaggi, M. Azqueta, A. López de Cerin, A. Vega, A. Abram, U. Costa-Fiho, A. "*Novel Cu(II) quinoxaline N¹, N⁴-dioxide complexes as selective hypoxic cytotoxins*" European Journal of Medicinal Chemistry, 40, 473-480, (2005)
 - 112.** Aguirre, G. Boiani, M. Cerecetto, H. Fernández, M. León, E. Pintos, C. Raymondo, S. Arredondo, C. Pacheco, JP. Basombrío, MA. "*Furoxan derivati as cytotoxic agents: Preliminary in vivo antitumoral activity studies*" Pharmazie, 61, 54-59, (2006)
 - 113.** Cerecetto, H. González, M. Onetto, S. Risso, M. Rey, A. Giglio, J. León, E. León, A. Pilatti, P. Fernández, M. "*Synthesis and characterization of thiol containing furoxan derivatives as coligands for the preparation of potential bioreductive*" Archive der Pharmazie, 339, 59-66, (2006)
 - 114.** Lavaggi, ML. Cabrera, M. González, M. Cerecetto, H. "*Differential enzymatic reductions governing the differential hypoxia-selective cytotoxicities of phenazine 5,10-dioxides*". Chemical Research Toxicology, 21, 1900-1906, (2008)
 - 115.** Lavaggi, ML. Cabrera, M. Aravena, MA. Olea-Azar, C. López de Ceráin, A. Monge, A. Pachón, G. Cascante, M. Bruno, AM. Pietrasanta, LI. González, M. Cerecetto, H. "*Study of nemzo[a]phenazine 7,12-dioxide as selective hypoxic cytotoxin-scaffold. Identification of aerobic-antitumoral activity through DNA fragmentation*" Bioorganic and Medicinal Chemistry, 18, 4433-4440, (2010)
 - 116.** Cunha, JD. Lavaggi, ML. Abasolo, M. Cerecetto, H. González, M. "*2D and 3D-quantitative structure activity relationship studies for a series of phenazine N,N'-dioxide as antitumour agents*" Chemical and Biology Drug Design, 78, 960-968, (2011).

- 117.** Lavaggi, ML. Cabrera, M. Pintos, M. Arredonde, C. Pachón, G. Rodríguez, J. Raymondo S. Pacheco, JP. Cascante, M. Olea-Azar, C. López De Cerain, A. Mongue, A. Cerecetto, H. González, M. “*Novel Phenazine 5,10-dioxides release •OH in simulated hypoxia and induce reduction of tumour volumen in vivo*” *ISRN Pharmacology*, 1-11, (2011)
- 118.** Lavaggi, ML. Nieves, M. Cabrera, M. Olea-Azar, C. López De Cerain, A. Mongue, A. Cerecetto, H. González, M “*Structural modifications of the phenazine N,N'-dioxide-scaffold looking for new selective hypoxic cytotoxins*” *European Journal of Medicinal Chemistry*, 45, 5362-5369, (2010)
- 119.** Lavaggi, ML. “*Hipoxia como diana terapéutica para el tratamiento de tumores sólidos: desarrollo de fármacos selectivos de N',N'-dióxido de fenzaina*” Tesina de Posgrado en Química, (2009)
- 120.** Lavaggi, ML. Nieves, M. Cabrera, M. Olea-Azar, C. López de Ceráin, A. Cerecetto, H. González, M. “*Structural modifications on the phenazine N-N'-dioxide-scaffold looking for newselective hypoxic cytotoxins*” *European Journal of Medicinal Chemistry*, 45, 5362-5369, (2010)
- 121.** Página web American Type Culture Collection (ATCC): www.atcc.org Visitado: octubre, 2019
- 122.** Pulaski, B.A. Ostrand-Rosenberg, S. “*Mouse 4T1 Breast Tumor Model*” *Current Protocols in Immunology*. (2000)
- 123.** Castro, C. Hogan, J. Benson, K. Shehata, C. Landaver, M. “*Behavioral effects pf vehicles: DMSO, ethanol, Tween-20, Tween-80, and emulphor-620*” *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 50(4), 521-526, (1995)
- 124.** Fu, Q. Satterlee, A. Wang, Y. Wang, Y. Wang, D. Tang, J. He, Z. Liu, F. “*Novel murine tumor models depend on strain and route of inoculation*” *International Journal of Experimental Pathology*, 94(7), 351-356, (2016)
- 125.** Caron, D. Savad, P. Doillan, C. “*Protein tyrosine phosphatase inhibition induces anti-tumor activity: Evidence of Cdk2/p27^{kip1} and Cdk2/SHP-1 complex formation in human ovarian cancer cells*”. *Cancer letters*, 262, 265-275, (2008)
- 126.** Página web Unidad de Reactivos y Biomodelos: www.urbefmed.org
- 127.** Página web Comisión Honoraria de Experimentación Animal: www.chea.edu.uy
- 128.** Fuentes, F de M. Mendoza, R. Rosales, A. Cisneros, R. “*Guía de manejo y cuidado de animales de laboratorio: ratón*” Centro Nacional de Productos Biológicos. Instituto Nacional de Salud. Lima, Perú (2008)
- 129.** Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Edición N°8. Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals; National Research Council (2010)
- 130.** Roux, S. Sablé, E. Porsolt, R. “*Primary Observation (Irwin) Test in Rodents for Assessing Acute Toxicity of a Test Agent and its Effects on Behavior and Physiological Function*” *Current Protocols in Pharmacology*.(2005)
- 131.** Clos, B. Banister, K. Baumans, V. “*Recomendaciones para la eutanasia de los animales de experimentación: Parte 1*” Somerset, UK. (1995)
- 132.** Faustino, A. Olivera, P. Pinho, J. “*Estimation of rat mammary tumor volume using caliper and ultrasonography measurements*” *Nature America*, 42 (6), 217-224, (2013)
- 133.** Navarro, J. Ramírez, R. Villagran, C. “*Manual de procedimientos recomendables para la investigación con animales*” SAMSARA, 1° edición, México, 2012

- 134.** Álvarez, I. *“Ciencia de animales de laboratorio”* Capítulo 13: Procedimientos experimentales: vías de administración obtención de fluidos. Departamento de cirugía experimental. Hospital Universitario. La Paz, Madrid, España.
- 135.** Chaves, P. *“Recogida de muestras para el laboratorio ¿Qué, cómo, cuál, cuánto?”* Madrid, España
- 136.** *“Manual de toma, manejo y envío de muestras de laboratorio”*. Ministerio de Salud Viceministerio de Políticas de Salud Dirección de Regulación y Legislación en Salud Instituto Nacional de Salud Laboratorio Nacional de Referencia. El Salvador (2013)
- 137.** *“Guía para la obtención, conservación y transporte de muestras para análisis toxicológico”* Programa Nacional de Prevención y Control de las Intoxicaciones Departamento de Salud Ambiental Dirección Nacional de Determinantes de la Salud e Investigación Ministerio de Salud de la Nación. Buenos Aires, Argentina. (2015)
- 138.** Presentación PPT. Curso: “Uso y manejo de animales de laboratorio” Facultad de Química, UdelaR. Docente: Dra. Jenny Saldaña. Laboratorio de Experimentación Animal. (2018)
- 139.** Chaves, P. *“Recogida de muestras para el laboratorio ¿Qué, cómo, cuál, cuánto?”* Madrid, España.
- 140.** Página web *“Atlas de Histología Vegetal y Animal”*, Universidad de Vigo, España: <https://mmegias.webs.uvigo.es/6-tecnicas/5-general.php> Visitado: agosto 2019
- 141.** M.L. Lavaggi, M. Nieves, M. Cabrera, et al. *“Structural modifications on the phenazine N,N'-dioxide-scaffold looking for new selective hypoxic cytotoxins”* European Journal of Medicinal Chemistry, 45, 5362-5369, (2010)
- 142.** González, M. Cerecetto, H. Mongue, A. *“Quinoxaline 1,4-Dioxide and Phenazine 5,10-Dioxide. Chemistry and Biology”*. Topics in Heterocyclic Chemistry, 11, 179-211, (2007)
- 143.** Cerecetto, H. González, M. Lavaggi, M.L. *“Preparation of Phenazine N⁵, N¹⁰-Dioxide. Effects of Benzofuroxan Substituents in the Outcome of their Expansion Reaction with Phenolates”*. Journal of the Brazilian Chemical Society, 16, 1290-1296, (2005)
- 144.** Dávila, B. Sánchez, C. Lecot, N. Cerecetto, H. *“Selective Hypoxia-Cytotoxin 7-Fluoro-2-Aminophenazine 5,10-Dioxide: Toward “Candidate-to-Drug” Stage in the Drug-Development Pipeline”*. ChemistrySelect, 4, 9396-9402, (2019)
- 145.** Sosnik, A. Carcaboso, A. Chiappetta, D. *“Polymeric Nanocarriers: New Endeavors for the Optimization of the Technological Aspects of Drugs”*. Recent Patents on Biomedical Engineering, 1, 43-59, (2008)
- 146.** Tabero, A. Weng-Jiang, X. Martínez, A. Acedo, P. *“Nanoterapias en el campo de la medicina”* Nanomedicina. Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular. (<https://sebbm.es/revista/articulo.php?id=370&url=nanoterapias-en-el-campo-de-la-biomedicina>)
- 147.** Myhren, G. Gyrid, N. Gausdal, G. *“Iodinin (1,6-dihydroxyphenazine 5,10 dioxide) from Streptosporanquium sp. Induces apoptosis selectively in myeloid leukemia cell lines and patients cells”* Marine Drugs, 11, 332-349, (2013)
- 148.** OECD 423, 2001. Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD), OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Guideline No. 423: Acute Oral Toxicity – Acute Toxic Class Method. (adopted December 17, 2001)
- 149.** Tesis de grado en Lic. Bioquímica de la estudiante Carina Sánchez
- 150.** Baptist du Prel, J. Röhrig, B. Hommel, G. *“Choosing Statistical Test”* Deutsches Arzteblatt International, 107(19), 343-348, (2010)
- 151.** Molina Arias, M. *“¿Qué significa realmente el valor de p?”* Revista pediatría atención primaria, 19(76), 377-381, Madrid, España (2017)

- 152.** Sterne, J. Davey, G. *"Sifting the evidence – What's wrong with significance test?"* Physical Therapy, 81(8), 1464-1469, (2001)
- 153.** Gómez, G. Cabo, E. *"Hablemos de...Análisis de supervivencia"* Departamento de Estadística e Investigación Operativa. Universitat Politècnica de Catalunya. Barcelona, España. Vol 3. N°4. 185-191. (2004)
- 154.** Fernández, S. *"Análisis de supervivencia"* Cadenos de Atención Primaria. Vol 2. 130-135. (1995)
- 155.** Arribalzaga, E. *"Interpretación de las curvas de supervivencia"* Revista Chilena de Cirugía. Versión Online. ISSN: 0718-4026. 59(1).75-83. 2007.
- 156.** Hosmer, D. Lemeshow, S. May, S. *"Applied Survival analysis: Regression modeling of time-to-event data (2nd ed.)"*. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, Inc. (2008)
- 157.** Kaplan, E. L. y Meier, P. Nonparametric estimation from incomplete observation. Journal of the American Statistical Association. 53(282), 457-481. <https://doi.org/10.1080/01621459.1958.10501452>.
- 158.** Gramatges, A. *"Aplicación y técnicas de análisis de supervivencia en las investigaciones clínicas"* Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia. Vol 18. N°2. Habana, Cuba. (2002)
- 159.** Página web: Food & Drug Administration (FDA) <https://www.fda.gov/> (Visitado 5 setiembre 2019)
- 160.** Trimiño Galindo L, Padrón Ramos MJ, Guardarrama Linares L, García Cuervo D, Rubiera García JM. *"Método clínico vs laboratorio clínico"*. Revista Médica Electrónica. Vol 33. (2011)
- 161.** Voet, D. Voet, J *"Bioquímica"* 3ra Edición. Editorial médica, Panamericana. Buenos Aires, Argentina. (2004)
- 162.** Varshney, A. Rehan, M. Subbarao, N. *"Elimination of Endogenous Toxin, Creatinine from Blood Plasma Depends on Albumin Conformation: Site Specific Uremic Toxicity & Impaired Drug Binding"* PLoS ONE. Vol 6(2). (2011)
- 163.** Here, R. *"Endogenous Creatinine in Serum and Urine"* Experimental Biology and Medicine. Vol 74 (1). 148-151 (1950)
- 164.** Henry, J. *"El Laboratorio en el Diagnóstico Clínico"* Edición Original. Editorial W.B Saunders Company. España. (2005)
- 165.** Hyder, M. Hasan, M. Hasan, A. *"Comparative levels of ALT, AST, ALP and GGT in Liver Associated Diseases"* European Journal of Experimental Biology. Vol 3(2). 280-284. (2013)
- 166.** Cifuentes, F. *"Hepatotoxicidad por fármacos"* Revista Clínica de Medicina de Familia. Vol 3 (3). 177-191. (2010).
- 167.** Fernández, A. García, M. Lucena, M. *"Análisis de las causas, características y consecuencias de la re-exposición a fármacos o compuestos responsables de un episodio de hepatotoxicidad"* Revista Española de Enfermedades Digestivas. Vol 100. 278-284- (2008)
- 168.** Abramson, N. Melton, B. *"Leukocytosis: Basics of Clinical Assessment"* Baptist Regional Cancer Institute. Jacksonville, Florida. (2011).
- 169.** Vargas, P. Hurtado, F. Villalobos, J. *"Esplenomegalia"* Revista de la Facultad de Medicina. Versión On Line. Vol (2). (2013)
- 170.** Roberts, A. Hasegama, M. Metcalf, D. *"Identification of a genetic locus modulating splenomegaly induced by granulocyte colony-stimulating factor in mice"* Leukemia. Vol 14(4). 657-661. (2000)
- 171.** Pozo, A. Bowels, E. *"Splenomegaly: Investigation, diagnosis and management"* Blood Review. Vol 23(3) 105-111 (2009)
- 172.** Paolini, R. Toffoli, S. Poletti, A. *"Splenomegaly as the First Manifestation of Thyroid Cancer Metastases"* Tumori Journal. Vol 83(4). 779-782. (1997)

- 173.** Hasadia, R. Kazarin, O. Sofer, O. "Splenoctomy for breast carcinoma diffusely metastatic to the spleen presenting as severe transfusion-dependent anaemia and thrombocytopaenia". *BMJ case reports* (2018)
- 174.** Jackson, W. Sosnoski, D.M. Ohanessian, S.E. "Role of Megakaryocytes in Breast Cancer Metastasis to Bone" *Cancer Research* (2017)
- 175.** Serganova, I. Rizwan, A. Ni, X. Thakur, S. Vider, L Russell. J. Blasberg, R. Koutcher, J. "Metabolic Imagin: A link between Lactate Dehydrogenase A, Lactate , and Tumor Phenotyoe" *Clinical Cancer Research*, 17 (19), 6250-6261, (2011)
- 176.** Proskurykav, S. Gabai, V. "Mechanism of Tumor Cell Necrosis" *Current Pharmaceutical Design*. 16(1). 56-58.
- 177.** Fischer, A. Jacobson, K. Roje, J. Zeller, R. "Hematoxylin and Eosin staining of tissue and cells sections" *Cold Spring Hab Protocol*. 2014
- 178.** Carlosama, Y. Reyes, N. Rolón, M. Rosero, E. "Biopsia por congelación: recomendaciones en la práctica clínica y dermatológica" *Revista Colombiana de Cancerología*. 18(2). 88-91. (2014).
- 179.** Brettas, M. Peixotor, R. Joanitti, G. Oliveira, R. Telles, L. Miranda, A. Bocca, A. Vianna, L. Da Silva, I. Souza, A. Lacava, Z. N Báó, S. "Antitumor effect and toxicity of free rhodium (II) citrate and rhodium (II) citrate-loaded maghemite nanoparticles in mice bearing breast cancer" *Journal of Nanobiotechnology*. 11(1). 1-13.
- 180.** Gregorio, A. Fonseca, N. Moura, V. Lacerda, M. Figueiredo, P. Simoes, S. Días, S. Moreira, J. "Inoculated Cell Density as a Determinant Factor of the Growth Dynamics and Metastatic Efficiency of a Breast Cancer Murine Model" DOI: PLOS ONE. 10.1371/journal.pone.0165817. (2016).
- 181.** Chen, C. Nong, Z. Xie, Q. He, J. Cai, W. Tang, X. Chen, X. Huang, R. Gao, Y. "2-Dedocyl-66-methoxy cyclohexa -2,5-diene-1,4-diane inhibits the growth and metastasis of breast carcinoma in mice" *Scientific reports*. 7. 1-12. (2017).