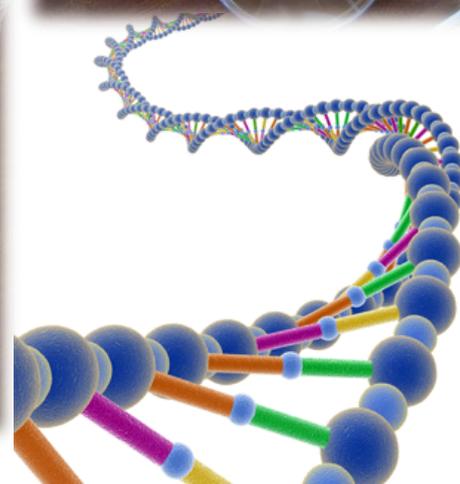
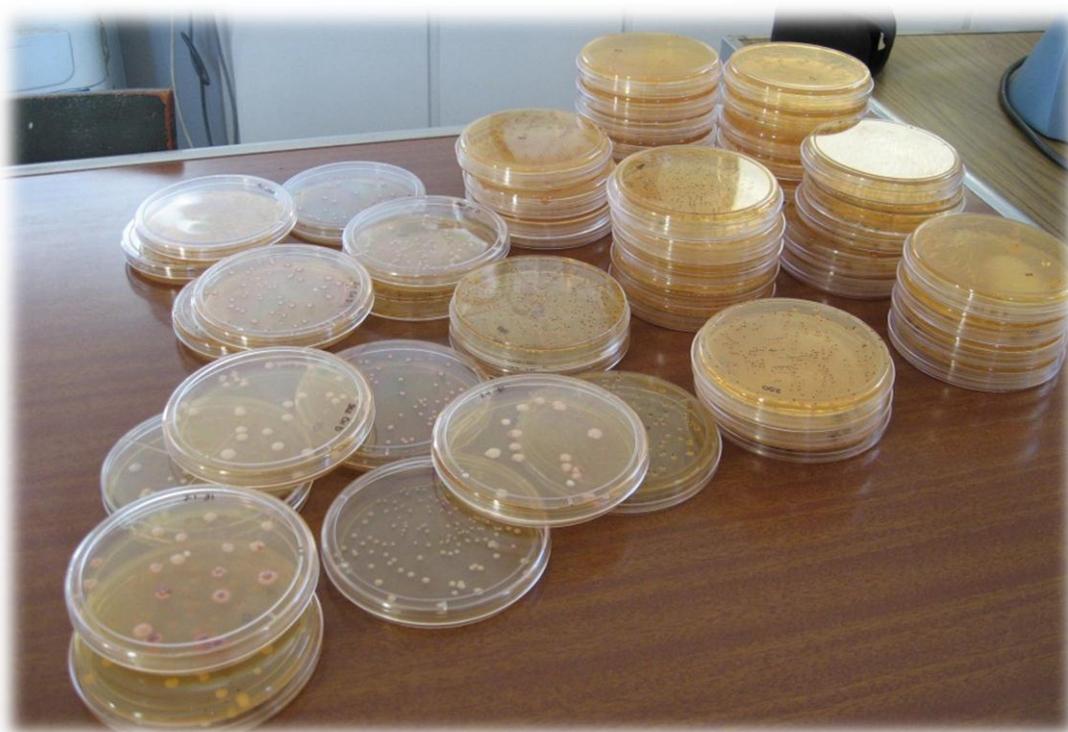


UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA  
FACULTAD DE CIENCIAS  
LICENCIATURA EN BIOQUÍMICA  
TESINA DE GRADUACIÓN



TÍTULO DE TESINA: “BÚSQUEDA DE INHIBIDORES  
DE ADN TOPOISOMERASAS DERIVADOS DE *N,N'*-  
DIÓXIDO DE FENAZINAS”

Br. Mariana Gonda

Directoras de tesis: Dra. Mercedes González

Dra. María Laura Lavaggi.

Julio de 2012

“Para alcanzar algo que nunca has  
logrado, tendrás que hacer algo  
que nunca has hecho”

Anónimo

## AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a Hugo y Mercedes, jefes del laboratorio y tutora del presente trabajo por brindarme la posibilidad de realizar esta tesina, gracias por compartir su conocimiento, por la paciencia a lo largo del trabajo y por acompañarme en mis primeros pasos como investigadora.

A María Laura, co-tutora del presente trabajo, gracias por tu constante dedicación y preocupación, por tu paciencia y por animarme a seguir adelante en los momentos que lo necesité. No solo me acompañaste en mis primeros pasos como investigadora sino que también ayudaste a mi formación como tal.

A mis compañeros del laboratorio de Química Orgánica los cuales me han acompañado durante mi trabajo, Virginia, Williams, Alicia, Paola, Mauricio, Guzmán, Natalia, Soledad, Luis, Gastón, Diego, Lorena, y Javier. Y a los compañeros más recientes del laboratorio, los cuales no nombro porque no quiero olvidarme de ninguno. Muchas gracias por compartir sus conocimientos y su tiempo, por siempre estar dispuestos a dar una mano. Tengo los mejores recuerdos de los momentos compartidos.

Quiero agradecer a Elia Nunes, Carmen Candreva, Olga Lillo y a todos los integrantes del Departamento de Biofísica de Facultad de Medicina, UdelaR, en donde realicé los ensayos de inhibición de la enzima topoisomerasa. Gracias por la colaboración en el tiempo que estuve trabajando allí.

A la Unidad de Química Analítica de la Universidad de Navarra por realizar los espectros de masa. A Horacio Pezaroglo por la realización de los espectros de resonancia magnética nuclear. Al Instituto de Química Biológica de la Facultad de Ciencias por permitirme utilizar el espectrofotómetro para registrar los espectros de fluorescencia. A Marcos Nieves quien me ayudó a realizar los ensayos de interacción con ADN.

También quiero agradecer a aquellas personas que me acompañaron de una forma especial en la realización de este trabajo. A mis padres, quienes me enseñaron a no rendirme ante los obstáculos y a perseguir mis metas, gracias por ser mi ejemplo de vida. A mis hermanos y a mi novio gracias por siempre estar ahí ayudándome a salir adelante, especialmente en los momentos difíciles cuando las cosas no iban como yo deseaba. Al resto de mi familia y a mis amigos, gracias por siempre animarme e impulsarme hacia adelante. Este trabajo se los dedico a ustedes, ya que sin su apoyo no lo hubiese logrado. Gracias por siempre creer en mí, no sé que haría sin ustedes.

Espero no olvidarme de nadie. A todos los que participaron en este trabajo ;muchas gracias!

## ÍNDICE GENERAL

<b>Abreviaturas.....</b>	<b>VI</b>
<b>Resumen.....</b>	<b>VII</b>
<b>1 Introducción.....</b>	<b>1</b>
1.1 Enfermedad del cáncer.....	1
1.2 Terapia del cáncer.....	5
1.3 ADN Topoisomerasas.....	9
1.4 Inhibidores de ADN Topoisomerasa I.....	15
1.5 Inhibidores de ADN Topoisomerasa II.....	23
1.6 Inhibidores mixtos.....	31
1.7 Modelos de estudio de inhibición de topoisomerasa mediante el uso de levaduras.....	33
Bibliografía.....	34
<b>2 Antecedentes.....</b>	<b>40</b>
2.1 Diseño racional de nuevos derivados de N,N'-dióxido de fenazina.....	40
2.2 Estudio de inhibición de topoisomerasa II utilizando el modelo de levaduras <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	45
Bibliografía.....	47
<b>3 Objetivos.....</b>	<b>50</b>
3.1 Objetivos generales.....	50
3.2 Objetivos específicos.....	50
<b>4 Resultados y Discusión: Síntesis química.....</b>	<b>52</b>
4.1 Síntesis de derivados de N <sup>5</sup> ,N <sup>10</sup> -dióxido de fenazina.....	52
4.2 Síntesis asistida por microondas de derivados de N <sup>5</sup> ,N <sup>10</sup> -dióxido de benciloxi y bencilaminofenazina.....	54

4.3 Síntesis de derivado de N <sup>5</sup> ,N <sup>10</sup> -dióxido de 7(8) bromofenzina-2-(4-metilfenil) sulfonamida.....	59
4.4 Reducción del derivado N <sup>5</sup> ,N <sup>10</sup> -dióxido de 7(8) bromofenzina-2-(4-metilfenil) sulfonamida.....	62
Bibliografía.....	65
<b>5 Resultados y Discusión: Biología.....</b>	<b>67</b>
5.1 Ensayo de inhibición de la enzima topoisomerasa II en levaduras <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	67
5.1.1 Puesta a punto del ensayo de inhibición de la enzima topoisomerasa II en levaduras.....	67
5.1.2 Cepas de levaduras.....	73
5.1.3 Inhibición de la enzima topoisomerasa II en levaduras por fenazinas.....	77
5.2 Estudios de selectividad en oxia-hipoxia de los derivados <b>7, 10</b> y <b>13</b> .....	82
5.3.1- Evaluación de la capacidad de interacción con ADN.....	83
5.3.2- Ensayo in vitro de bio-reducción en condiciones de normoxia/hipoxia.....	88
Bibliografía.....	92
<b>6 Conclusiones.....</b>	<b>95</b>
<b>7 Materiales y Métodos.....</b>	<b>98</b>
7.1 Síntesis y caracterización espectroscópica.....	98
7.2 Estudio teórico de las propiedades esteroelectrónicas de los derivados de N,N <sup>2</sup> -dióxidos de fenazina.....	102
7.3 Ensayo de inhibición de la enzima topoisomerasa II en levaduras <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	102
7.4 Evaluación de la capacidad de interacción con ADN.....	105
7.5 Ensayo in vitro de bio-reducción en condiciones de normoxia/hipoxia.....	106
Bibliografía.....	106

## ABREVIATURAS

18-C-6: Éter corona (18-crown-6)

AQ4N: banoxantrona

CC: cromatografía en columna

CCF: cromatografía en capa fina

CH<sub>3</sub>CN: aceto nitrilo

<sup>13</sup>C-RMN: resonancia magnética del carbono

DMSO: dimetilsulfóxido

EM: espectrometría de masas

HMBC: del inglés, Heteronuclear Multiple Bond Correlation

HSQC: del inglés, Heteronuclear Single Quantum Coherence

<sup>1</sup>H-RMN: resonancia magnética del protón

If: intensidad de fluorescencia

K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>: carbonato de potasio

PEG 6000: polietilenglicol 6000

Rf: del inglés, Ratio of front

RMN: resonancia magnética nuclear

TB: del inglés, Toluidine Blue (azul de toluidina)

## RESUMEN

Cuando una célula normal sufre una transformación maligna, la misma comienza a dividirse muy rápidamente generando una masa tumoral conocida como tumor sólido. Si el tumor tiene la capacidad de invadir tejidos circundantes y generar daño en los mismos, se define como tumor maligno y da origen al cáncer. Estos tumores presentan características biológicas únicas, ya que su crecimiento acelerado provoca que zonas internas del tumor se alejen de los vasos sanguíneos, generando en consecuencia zonas hipóxicas.

Las zonas hipóxicas confieren resistencia a terapias antitumorales como la quimioterapia y la radioterapia. Esta desventaja generada por las zonas hipóxicas puede considerarse una ventaja, si se toma a las mismas como blanco terapéutico. Esto llevó al desarrollo de agentes citotóxicos selectivos en hipoxia, también conocidos como profármacos bio-reducibles. Estos compuestos son inactivos *per se*, se reducen química o enzimáticamente en condiciones hipóxicas, generando radicales libres o especies citotóxicas. Esta bio-reducción es revertida en presencia de O<sub>2</sub>. Nuestro grupo de investigación ha desarrollado profármacos citotóxicos selectivos hacia células hipóxicas, derivados de N<sup>5</sup>,N<sup>10</sup>-dióxido de fenazina.

En el presente trabajo de tesina de grado se modificaron estructuralmente los derivados de N<sup>5</sup>,N<sup>10</sup>-dióxido de fenazina, desarrollados previamente que mostraron buen perfil citotóxico en oxia/hipoxia. Estos compuestos combinan dos agrupamientos químicos bio-activos; un sistema bio-reducible, la función N-óxido, y por otro lado una estructura plana, el sistema fenazina, que podría interactuar con el ADN. A esta estructura se le añade una cadena lateral flexible con el fin de mejorar su interacción con el ADN, y lograr una interacción con el sistema binario ADN-topoisomerasa, siendo posibles inhibidores de las enzimas ADN topoisomerasa I y/o topoisomerasa II. De esta manera se diseñan los derivados de N<sup>5</sup>,N<sup>10</sup>-dióxido de benciloxi, bencilamino y sulfonamida fenazina. Así estos se evalúan como inhibidores de la ADN topoisomerasa II en un modelo *in vitro* utilizando levaduras *Saccharomyces cerevisiae*. Además se evalúa la capacidad de interacción de los mismos con ADN y de bio-reducirse en condiciones de oxia/hipoxia.

De los derivados desarrollados, el derivado de N<sup>5</sup>,N<sup>10</sup>-dióxido de benciloxi fenazina presentó inhibición de la enzima topoisomerasa II presente en levaduras, sin presentar interacción con ADN.

## INTRODUCCIÓN

### **1.1-Enfermedad del cáncer**

#### Generalidades

Las células de un organismo pluricelular están comprometidas a colaborar entre ellas. Coordinan su comportamiento, emitiendo, interpretando, elaborando y recibiendo señales que actúan como controles sociales. Esta comunicación indica a las células el momento de dividirse, de mantenerse en estado quiescente, de diferenciarse o de morir, por el bien del organismo. El problema surge cuando estos controles sociales se rompen, cuando una mutación no sólo altera a una célula, sino que le proporciona una ventaja selectiva frente a las demás, dividirse rápidamente y así convertirse en la fundadora de un clon mutante en crecimiento, generando así las bases del cáncer. El cáncer es una enfermedad en la cual clones de células mutantes empiezan a prosperar a expensas de sus células vecinas, destruyendo finalmente toda la sociedad celular<sup>1</sup>. Esta proliferación descontrolada de células mutantes puede resultar en la formación de una masa celular conocida como tumor sólido<sup>1</sup>.

Los tumores se clasifican en varias categorías según su origen y naturaleza. Los tumores en donde las células permanecen agrupadas, se llaman tumores benignos. Mientras que aquellos tumores que tienen la capacidad de sobrepasar los límites del tejido que le dio origen, invadiendo tejidos circundantes y causando daño en los mismos, se definen como tumores malignos y dan origen al cáncer<sup>2</sup>. Los tumores sólidos se clasifican de acuerdo con el tejido y con el tipo celular del cual se originan. De esta manera se distinguen los carcinomas, que derivan de células epiteliales, los sarcomas que derivan de tejido conjuntivo o de fibras musculares y los linfomas que se originan de células del sistema inmunitario. Otros tipos de cáncer son la leucemia que deriva de células hematopoyéticas y el cáncer derivado del sistema nervioso. Estos últimos, por lo general no forman tumores sólidos<sup>1,3</sup>.

Las mutaciones y los cambios epigenéticos que sufren las células, presentes en los tumores malignos, generan en las mismas cambios fenotípicos, que permiten diferenciarlas de células normales. Dentro de los cambios fenotípicos se encuentran alteraciones morfológicas<sup>2</sup> y funcionales<sup>4</sup>.

Cambios morfológicos:

- Anaplasia. Son células no especializadas, de apariencia indefinida.
- Pleomorfismo. Las células tumorales presentan diferente tamaño con respecto a sus vecinas, pueden ser más grandes o más pequeñas.

- Morfología nuclear anormal. Los núcleos tienen mucho ADN y se tiñen intensamente. Contienen núcleos grandes, la proporción núcleo citoplasma es 1 a 1 aproximadamente, cuando lo normal es 1 a 4 ó 1 a 6 (núcleo/citoplasma).
- Mitosis. Presentan una tasa de proliferación elevada.
- Pérdida de la polaridad. Hay una pérdida de la orientación citológica, el crecimiento celular es desorganizado.

#### Cambios funcionales:

- Autonomía o independencia de factores de crecimiento.
- Insensibilidad a factores inhibitorios del medio.
- Evasión de la apoptosis.
- Alteraciones en la reparación de ADN.
- Potencial replicativo ilimitado.
- Angiogénesis.
- Capacidad de invasión y metástasis.
- Evasión del sistema inmune.

Todos estos cambios funcionales le permiten a las células tumorales replicarse ilimitadamente y crecer independientemente de las señales que se encuentran en el medio extracelular, sobreviviendo sin que sus mutaciones sean reparadas, evadiendo mecanismos de muerte celular programada o apoptosis. También desarrollan mecanismos de supervivencia que le permiten evadir al sistema inmune, para que el mismo no las reconozca y las elimine<sup>4</sup>.

Por otro lado, las células tumorales frente a diferentes estímulos como la hipoxia (baja presión de O<sub>2</sub>), son capaces de estimular la formación de neovasos a partir de vasos sanguíneos preexistentes, proceso que se denomina angiogénesis, de esta manera logran obtener nutrimentos y seguir creciendo. La angiogénesis también permite que las células que se desprendan de la masa tumoral primaria, migren por el torrente sanguíneo e invadan y dañen a otro tejido en un sector distante al sitio primario, generando metástasis<sup>4</sup>. Las células presentes en los tumores sólidos en general presentan la capacidad de invadir y generar metástasis. La invasión se refiere a la migración y penetración en los tejidos vecinos; mientras que la metástasis se refiere a la habilidad de las células de penetrar en el torrente sanguíneo o en el sistema linfático, invadiendo cualquier tejido del cuerpo<sup>5</sup>.

Tumores sólidos

Como se ha mencionado anteriormente, cuando una célula normal sufre una transformación maligna que la convierte en célula tumoral, el ciclo celular de esta célula dañada se sale de control, dividiéndose muy rápidamente, ya que no tiene restricciones para ingresar al ciclo celular. Es por esto que las células tumorales son células que se caracterizan por tener una tasa de proliferación elevada, lo que genera la formación de una masa celular que se conoce como tumor sólido<sup>2,4</sup>.

El crecimiento de la masa tumoral se da de forma acelerada provocando que zonas internas del tumor sólido se alejen de los vasos sanguíneos, por lo cual el mismo va a presentar zonas deficientes en presión de oxígeno y nutrimentos (figura 1.1.1)<sup>6</sup>.

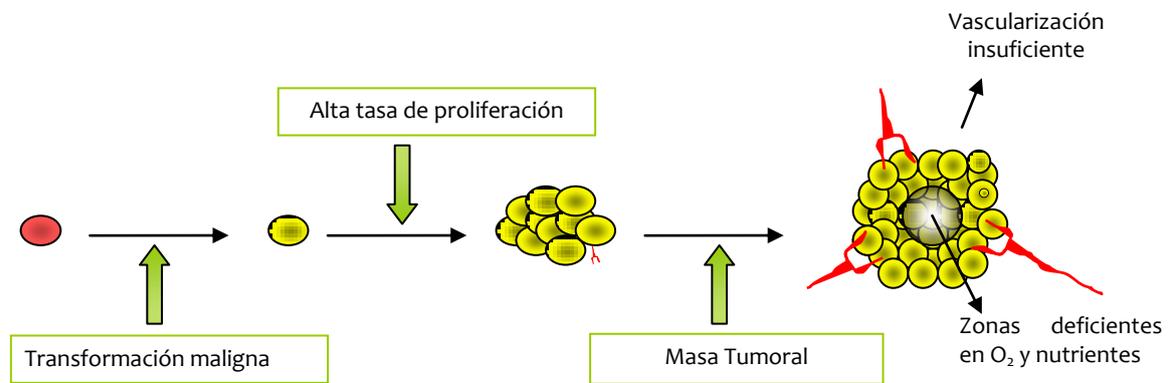


Figura 1.1.1- Etapas que dan origen a la formación de un tumor sólido y la posterior generación de zonas deficientes en oxígeno y nutrimentos.

En un tumor sólido se pueden distinguir tres zonas de diferente presión de oxígeno; una zona interna, formada por células necróticas, en donde la presión de oxígeno es muy baja y no hay casi nutrimentos, ya que es la zona más alejada de los vasos sanguíneos; una zona intermedia hipóxica de baja presión de oxígeno y nutrimentos; y una zona de normoxia que se encuentra más cerca de los vasos sanguíneos, en donde las células viven con el oxígeno y los nutrimentos adecuados (figura 1.1.2)<sup>6</sup>.

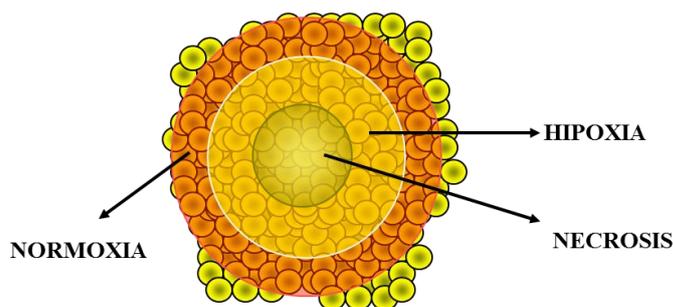
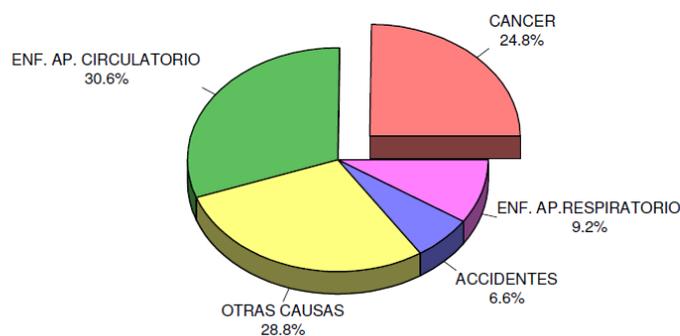


Figura 1.1.2- Se muestran las tres regiones que se pueden encontrar en un tumor sólido, las mismas se generan por las diferentes presiones de oxígeno.

Esta vascularización inadecuada le confiere características biológicas únicas al tumor, como presentar zonas hipóxicas y necróticas<sup>7</sup>. Las células tumorales que se encuentran en una región hipóxica, disminuyen su tasa de proliferación por la disminución de nutrientes<sup>6</sup>. Además la glucólisis que realizan las células se da en presencia de baja presión de O<sub>2</sub>, por lo que la glucólisis resulta en la producción de lactato que causa un sustancial descenso del pH extracelular, alcanzando valores de pH próximos a 6<sup>8</sup>.

### Epidemiología

En Uruguay, los tumores malignos constituyen la segunda causa de mortalidad, luego de las enfermedades cardiovasculares<sup>9</sup>. En el gráfico que se muestra la *figura 1.1.3* se puede observar que el cáncer es responsable del 25% de las muertes en Uruguay<sup>10</sup>.



*Figura 1.1.3- Mortalidad en el Uruguay en el año 2008. Fuente: División Estadística. Ministerio de Salud Pública.*

En los gráficos de la *figura 1.1.4* se muestran los porcentajes de incidencia de los cánceres más frecuentes en hombres y mujeres uruguayos, entre los años 2004 y 2008, según el Registro Nacional de Cáncer. Siendo los más frecuentes y de mayor mortandad el de pulmón y próstata en el hombre, y el cáncer de mama en la mujer<sup>10</sup>.

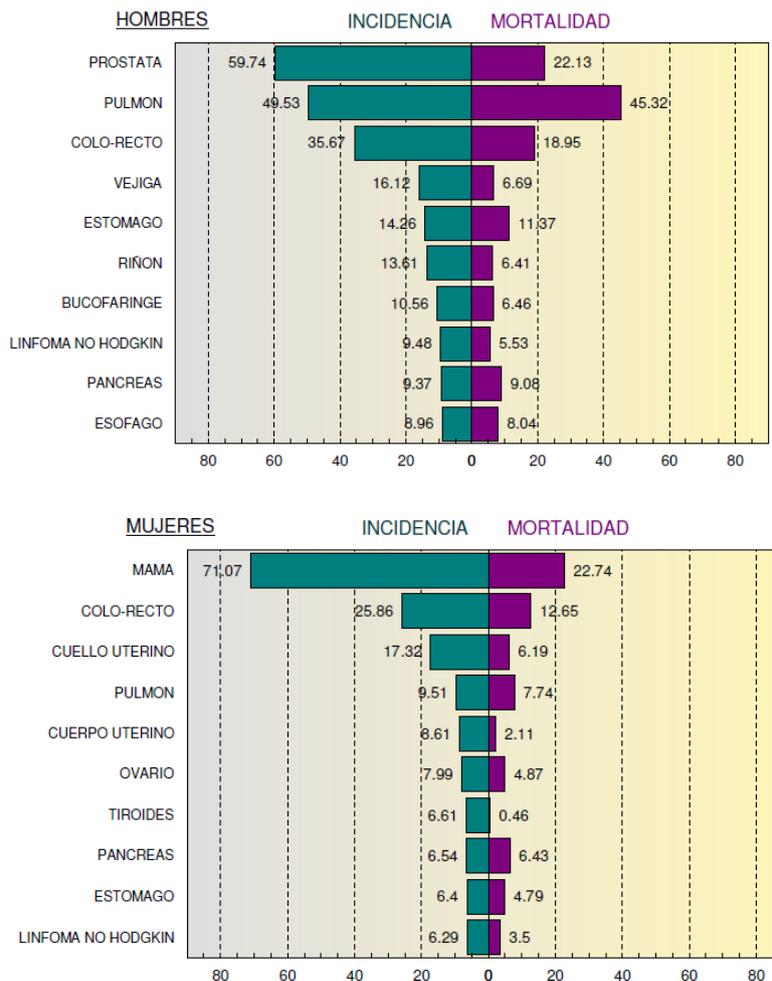


Figura 1.1.4- Incidencia del cáncer en hombres y mujeres uruguayos entre 2004 y 2008. Se expresa la tasa de incidencia ajustada a la población. Fuente: Registro Nacional de Cáncer-Programa Vigilancia Epidemiológica; Comisión Honoraria de Lucha Contra el Cáncer.

### 1.2-Terapia del cáncer

#### Generalidades

La terapia más antigua para el tratamiento del cáncer es la cirugía. La extirpación quirúrgica es un método seguro para curar pacientes que presentan tumores sólidos, cuando el tumor se encuentra confinado en su sitio de origen<sup>11</sup>. Actualmente se han desarrollado nuevas metodologías quirúrgicas, menos invasivas, como la laparoscopia quirúrgica<sup>12</sup>. La extirpación quirúrgica además de ser un tratamiento local, también se utiliza como terapia preventiva, para diagnóstico, como terapia paliativa y de reconstrucción y rehabilitación. Sin embargo, esta terapia local no es suficiente cuando las células tumorales invaden otros tejidos que no es

el de origen, y deben agregarse tratamientos complementarios como la radioterapia o quimioterapia<sup>11</sup>.

La radioterapia se utiliza para el tratamiento de tumores localizados. La misma se basa en la irradiación del tumor, ya sea con fotones o partículas. La radiación ionizante al interactuar con material biológico genera ionización y radicales libres. Estos son los principales mecanismos que provocan daño en el ADN, generando así en las células, senescencia o apoptosis<sup>13</sup>.

La quimioterapia se aplica en el caso de tumores sólidos, cánceres hematológicos y linfáticos<sup>14</sup>. Como en general los cánceres hematológicos no forman tumores sólidos, la extirpación quirúrgica y la radioterapia no son tratamientos efectivos, ya que son localizados. En el caso de los tumores sólidos, la quimioterapia se utiliza como tratamiento adyuvante de tratamientos locales, para prevenir la invasión de otros tejidos y la metástasis. También se utiliza en cánceres avanzados que presentan metástasis<sup>15</sup>.

Las primeras moléculas que se desarrollaron como agentes quimioterápicos fueron los agentes alquilantes. Entre ellos se encuentran los alquilsulfonatos, aziridinas, triazinas, mostazas nitrogenadas, nitrosoureas<sup>16</sup>. Otros agentes quimioterápicos son los análogos de platino<sup>17</sup>, los antimetabolitos<sup>18</sup>, los agentes inhibidores de enzimas, entre otros.

Actualmente están en estudio terapias inmunológicas para el tratamiento del cáncer. Ya se han desarrollado vacunas preventivas, un ejemplo es la vacuna contra el virus del papiloma humano (HPV), que está asociado al desarrollo de cáncer de cérvix<sup>19</sup>.

#### Desventajas de las terapias

Los tratamientos con radioterapia y quimioterapia presentan varias desventajas. La dosis en que se irradia o que se prescribe el fármaco, se ve limitada por la citotoxicidad que las mismas presentan frente a las células sanas<sup>6</sup>. Esto ocurre porque ambas terapias tienen como blanco terapéutico características comunes entre las mismas y las células tumorales. En la radioterapia, la misma puede presentar cierta selectividad hacia el tumor, ya que la radiación se focaliza en el mismo, pero el tejido sano que lo rodea también recibe radiación, viéndose afectado. En la quimioterapia, la mayoría de los fármacos que se utilizan tienen como blanco terapéutico células que tienen una alta tasa de proliferación, esto hace que las células tumorales se vean afectadas, ya que como se mencionó anteriormente las mismas presentan esta característica. Sin embargo, hay células presentes en tejidos sanos que también tienen una elevada tasa de proliferación, como ser las células de la médula ósea, de los folículos pilosos, células epiteliales que recubren el tracto gastrointestinal; que también sufren el efecto

citotóxico de los fármacos quimioterápicos<sup>6</sup>. Otro efecto secundario que se ha observado es a nivel del sistema cardiovascular<sup>20</sup>.

#### Resistencia de tumores sólidos a las terapias

Otra desventaja que presentan ambas terapias, es que las zonas hipóxicas presentes en los tumores sólidos son resistentes a las mismas. Esto se debe, a que estas zonas presentan baja presión de O<sub>2</sub>, ya que están alejadas de los vasos sanguíneos (*figura 1.1.1 y 1.1.2*). La resistencia de los tumores sólidos a la radioterapia se debe a que la presencia de oxígeno es lo que le confiere sensibilidad a las radiaciones ionizantes. Estas radiaciones producen daño generando radicales en el ADN. Los radicales sufren un proceso de oxidación por el oxígeno, que genera la lesión en el ADN. Cuando hay baja presión de O<sub>2</sub>, los radicales sufren un proceso de reducción, que repara la lesión en el ADN<sup>7</sup>.

La resistencia a la quimioterapia se debe a múltiples factores. Las zonas hipóxicas se encuentran distantes de los vasos sanguíneos, por lo tanto las células hipóxicas van a tener menos exposición a la concentración del fármaco deseada, que las células que se encuentran en la superficie del tumor, ya que éstas actúan como un filtro. Los fármacos antitumorales son más efectivos contra células con alta tasa de proliferación. Como se mencionó anteriormente, en la descripción de los tumores sólidos, las células presentes en las zonas hipóxicas disminuyen su tasa de proliferación por falta de nutrientes; lo que las hace más resistentes a los fármacos antitumorales. La acción de los fármacos también puede verse disminuida por la ausencia de O<sub>2</sub>, como en el caso del fármaco etopósido (*sección 1.5*); o por alteraciones en el gradiente de pH, como en el caso de los agentes alquilantes<sup>21</sup>.

#### Profármacos selectivos en hipoxia.

Dada la resistencia que presentan las zonas hipóxicas a la radioterapia y a la quimioterapia, se desarrollaron fármacos antitumorales cuyo blanco terapéutico son las células hipóxicas<sup>7</sup>. De esta forma los fármacos adquieren especificidad por los tumores, disminuyendo sus efectos secundarios y aumentando su eficacia<sup>22</sup>. Los profármacos son reducidos por enzimas óxido-reductasas presentes en las células, generando radicales o especies citotóxicas. Esta bio-reducción es revertida en presencia de O<sub>2</sub>, generando un profármaco no citotóxico y el radical superóxido, el cual en general, es menos citotóxico que las especies que se producen por bio-reducción<sup>7</sup> (*figura 1.2.1*).

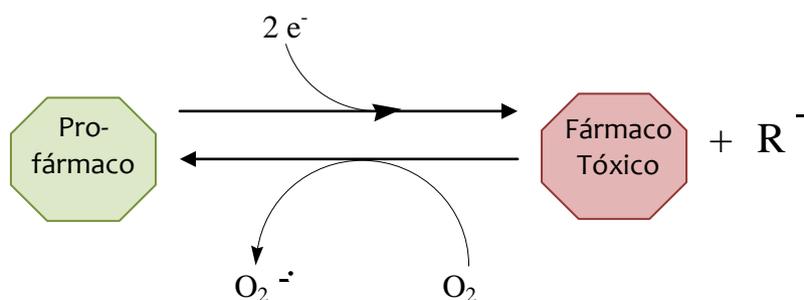


Figura 1.2.1- Profármacos citotóxicos selectivos en hipoxia. La bio-reducción se revierte en presencia de oxígeno, generando el radical superóxido.

Hasta el momento existen diversos agrupamientos químicos que han demostrado diferente grado de selectividad en condiciones de hipoxia<sup>23</sup>. Entre ellos cabe destacar las quinonas (Mitomicina C, Ia; E09, Ib; figura 1.2.2)<sup>6</sup>, los nitroaromáticos (misonidazol; RSU 1069, II, figura 1.2.2)<sup>6</sup>, y los derivados de N-óxido de aminas heterocíclicas aromáticas y alifáticas (tirapazamina, 3-amino-1,2,4-benzotriazina-1,4-dioxido, III figura 1.2.2)<sup>6,7,22</sup>, dióxido de quinoxalinas (dióxido de 2-amino-3-ciano-6-cloroquinoxalina, IV, figura 1.2.2)<sup>24,25,26</sup> y AQ4N (V, figura 1.2.2)<sup>7</sup>.

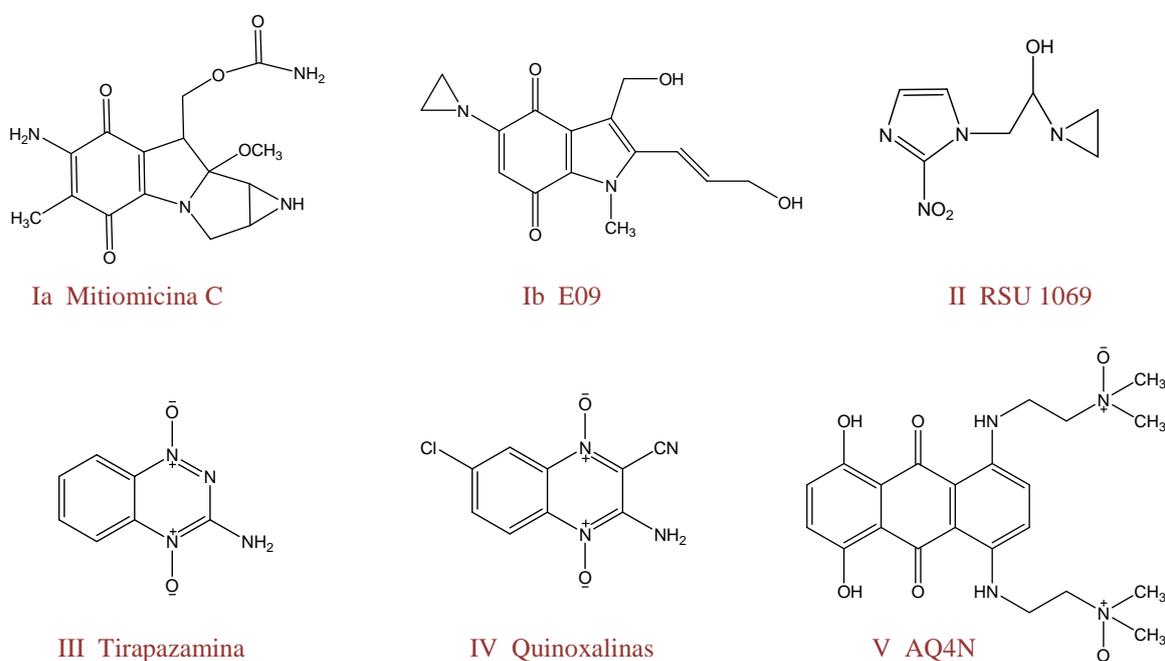


Figura 1.2.2 Algunos profármacos bio-reducibles

Considerando a la hipoxia como blanco terapéutico también se han desarrollado otras terapias. La terapia génica utiliza dentro de las características de las zonas hipóxicas, el factor inducible en hipoxia HIF-1 como blanco terapéutico, que interviene en diferentes procesos como la angiogénesis<sup>7</sup>. Otra metodología descrita en la terapia génica, es la utilización de una

bacteria recombinante anaerobia no patógena, de la cepa *Clostridium*. Esta bacteria recombinante, contiene un plásmido, que tiene un gen que codifica para la enzima que va a transformar al profármaco en el fármaco<sup>6,7</sup>.

### 1.3-ADN Topoisomerasas

#### Generalidades

Las ADN topoisomerasas son enzimas altamente conservadas, que están involucradas en el mantenimiento de la integridad del genoma celular<sup>27</sup>. Se encuentran en todos los organismos, incluyendo *Archaeobacteria*, virus, levaduras, *Drosophila* y humanos<sup>28</sup>. Estas enzimas tienen la función de controlar y modificar los estados topológicos del ADN; su mecanismo de acción es catalizar la rotura y unión concertada de las hebras del mismo<sup>29</sup>.

La importancia de estas enzimas para todas las células, se debe a la estructura de doble hélice del ADN<sup>28</sup>. Las topoisomerasas resuelven el estrés de torsión, que se genera al separar las hebras que forman la doble hélice, en procesos como la replicación del ADN, la transcripción, la recombinación y la remodelación de la cromatina. Las topoisomerasas evitan el superenrollamiento excesivo que es deletéreo y controlan la topología del ADN de diferentes formas. Algunas topoisomerasas sólo pueden relajar (quitar) giros superhelicoidales negativos, otras pueden relajar tanto superenrollamientos positivos como negativos y otras pueden introducir superenrollamientos negativos (ADN girasa) o positivos (girasa reversa) en el ADN<sup>30</sup> (figura 1.3.1)<sup>31</sup>.

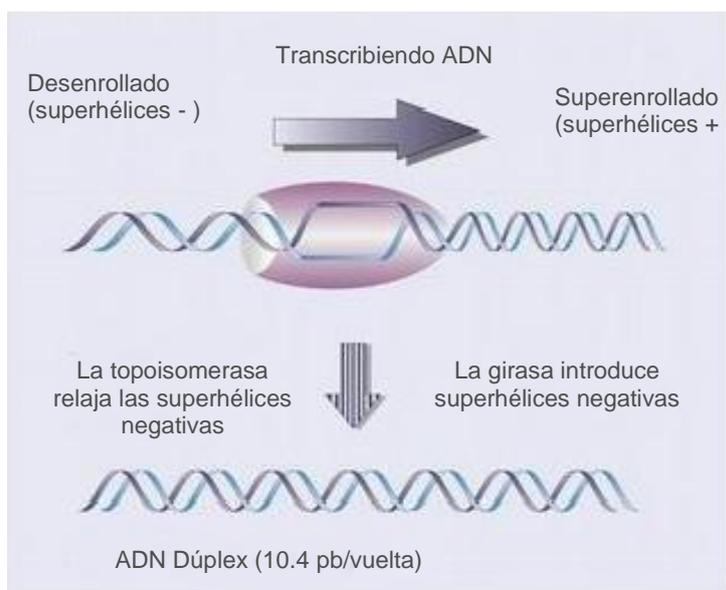


Figura 1.3.1- Diferentes estados topológicos del ADN<sup>31</sup>.

### Clasificación de las ADN topoisomerasas.

La primera caracterización de estas proteínas fue en 1970, cuando se descubrió la ADN topoisomerasa I y la ADN girasa de *Escherichia coli*<sup>32</sup>. Hasta el momento se han encontrado diferentes tipos y subtipos de ADN topoisomerasas en células procariotas y eucariotas<sup>30</sup>.

Las topoisomerasas se clasifican en dos tipos. La topoisomerasa de tipo I, corta una hebra simple de ADN y permite el pasaje de otra hebra simple a través del corte, seguido de la religación de la hebra. La topoisomerasa de tipo II, corta una doble hebra de ADN y permite el pasaje de otra doble hebra, religando ambas hebras al final<sup>30</sup>.

A su vez las topoisomerasas de tipo I se clasifican en dos subfamilias. Las topoisomerasas que se unen covalentemente al extremo 5' terminal del ADN, pertenecen a la subfamilia IA. Mientras que, las topoisomerasas que se unen covalentemente al extremo 3' terminal del ADN, pertenecen a la subfamilia IB<sup>30</sup>.

La topoisomerasa de tipo II también se puede clasificar en dos subfamilias, IIA y IIB. Las mismas son estructuralmente diferentes, pero actúan por mecanismos similares, ambas forman el enlace covalente transitorio con el extremo 5' terminal del ADN<sup>27</sup>.

Las células de levadura *Saccharomyces cerevisiae* (eucariotas inferiores) presentan tres tipos diferentes de topoisomerasas; la topoisomerasa I (perteneciente a la subfamilia IB), la topoisomerasa II (perteneciente a la subfamilia IIA) y la topoisomerasa III (perteneciente a la subfamilia IA). Los eucariotas superiores tienen como las levaduras una única isoforma de la topoisomerasa I (IB). Sin embargo, tienen dos isoformas de la topoisomerasa IIA (II $\alpha$ , II $\beta$ ) y dos isoformas de la topoisomerasa III (III $\alpha$ , III $\beta$ )<sup>30</sup>.

### a-ADN topoisomerasa I

#### Estructura<sup>30,33</sup>

La ADN topoisomerasa I humana es un monómero de 91 kDa, formado por 765 aminoácidos (aa). La proteína se divide en cuatro dominios diferentes, el dominio N-terminal, el dominio del Core, el dominio del *linker*, y el dominio C-terminal (*figura 1.3.2*).

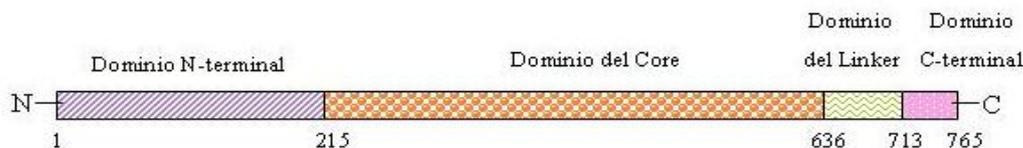


Figura 1.3.2.- Estructura en dominios de la topoisomerasa I. Los límites de los dominios se establecen en base a la alineación de secuencias, estudios proteolíticos y estructuras cristalográficas de la proteína<sup>30</sup>.

El dominio del Core contiene todos los residuos involucrados en la catálisis, a excepción de la Tyr723 que se encuentra en el sitio activo. Este aminoácido que interviene en la catálisis se encuentra en el dominio C-terminal. En la figura 1.3.3 se observa al complejo ADN-topoisomerasa I.

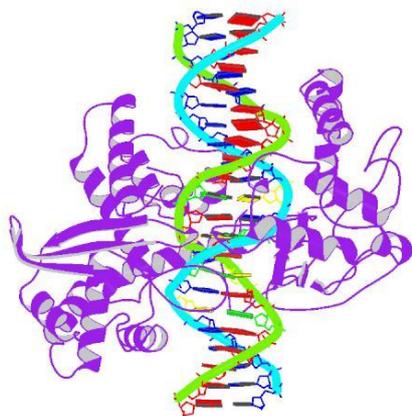


Figura 1.3.3- Estructura cristalográfica del complejo ADN-topoisomerasa I<sup>34</sup>.

### Mecanismo de acción<sup>30,33</sup>

La topoisomerasa de tipo I (subfamilia IB) relaja superenrollamientos positivos y negativos. Lo lleva a cabo mediante el corte de una hebra simple de ADN y el pasaje de otra hebra simple a través del corte, seguido de la religación de la hebra. El corte en una de las hebras comienza con el ataque nucleofílico del oxígeno, presente en el grupo hidroxilo de la Tyr723 (figura 1.3.4), sobre el grupo fosfato presente en el ADN. De esta manera, se genera un enlace covalente fosfodiéster entre la Tyr723 y el fosfato 3', dejando un grupo hidroxilo libre en la posición 5' en el sitio de corte. Posteriormente al pasaje, la hebra es religada, restaurándose la doble hebra de ADN. La religación en principio sería mecanísticamente el proceso inverso de la reacción de corte de hebra. El mecanismo de acción se muestra en la figura 1.3.5.

Para la catálisis esta enzima no requiere ATP, ni cationes divalentes, aunque el  $Mg^{2+}$  y el  $Ca^{2+}$  potencian el grado de relajación.

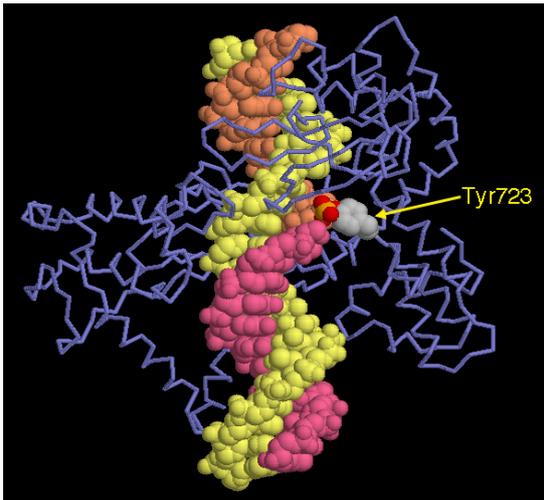


Figura 1.3.4- La enzima topoisomerasa I relajando una hebra de ADN. La Tyr723 que se representa mediante radios de Van der Waals, rompe una de las hebras de ADN formando un enlace covalente. La hebra que ha sufrido el corte se representa con los colores naranja y rosado, el cambio de color se da en la zona que fue realizado el corte<sup>35</sup>.

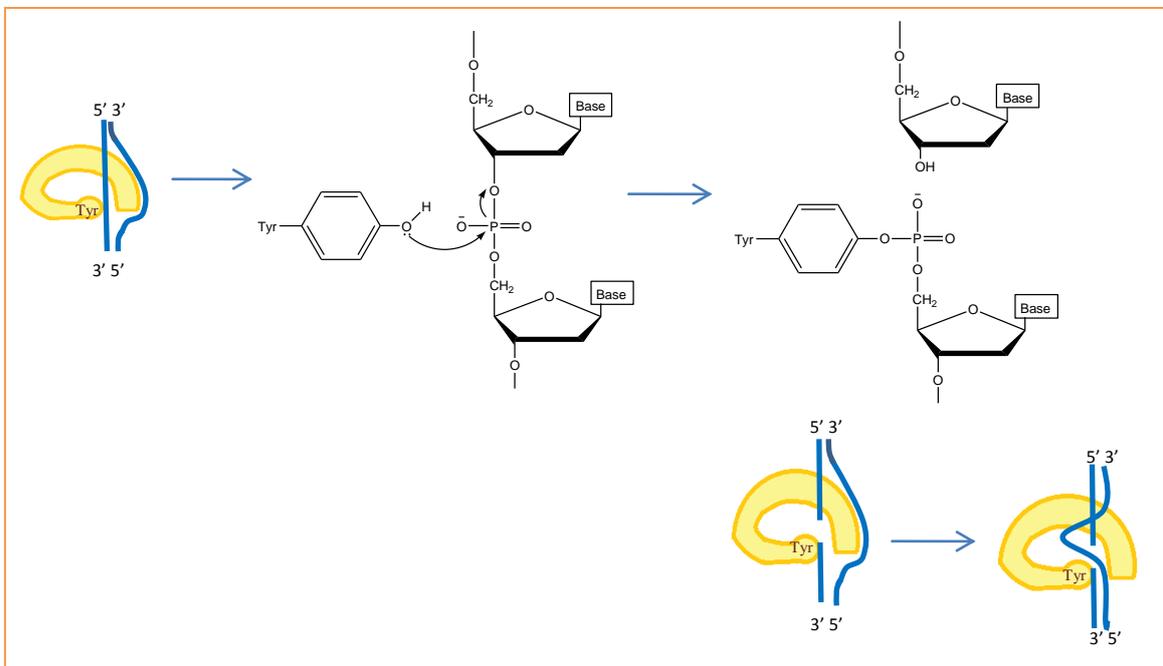


Figura 1.3.5- Mecanismo de acción de la ADN topoisomerasa I. La enzima se une al ADN y el oxígeno de la Tyr723 realiza un ataque nucleofílico sobre el grupo fosfato del ADN, generando así un enlace covalente transitorio. Adaptado de Lehninger<sup>36</sup>.

### b- ADN topoisomerasa II

#### Estructura

Todas las ADN topoisomerasas II presentes en eucariotas son homodímeros (figura 1.3.6) a diferencia de los procariontes, que son heterodímeros o heterotetrámeros<sup>30</sup>. Dentro de los eucariotas, los eucariotas inferiores presentan una sola isoforma de la enzima ADN

topoisomerasa II; a diferencia de los vertebrados, que contienen dos isoformas de esta enzima, ADN topoisomerasa II $\alpha$  y ADN topoisomerasa II $\beta$ <sup>27,30</sup>.

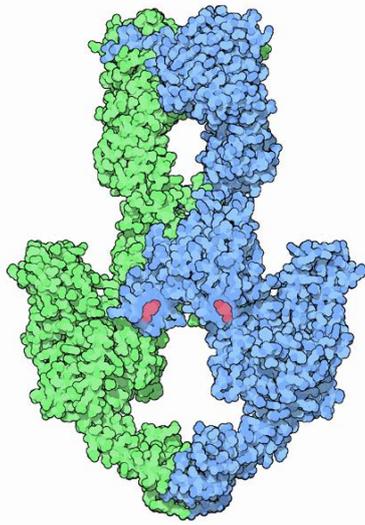


Figura 1.3.6- Estructura de la enzima topoisomerasa II. Los monómeros se representan en verde y azul. Las tirosinas que participan de la catálisis se representan en rojo<sup>35</sup>.

La topoisomerasa II $\alpha$  y la topoisomerasa II $\beta$  humanas son enzimas homólogas, que comparten el 70% de su secuencia aminoacídica, pero son codificadas por diferentes genes. Las mismas presentan actividades catalíticas similares, pero están involucradas en diferentes funciones fisiológicas. La topoisomerasa II $\alpha$  se expresa en células que se dividen rápidamente, en especial en fase S y G<sub>2</sub> + M del ciclo celular. Por lo tanto, la misma es esencial para la proliferación celular y para la regulación de eventos del ciclo celular, como la replicación del ADN, la condensación y segregación cromosómica. La topoisomerasa II $\beta$  a diferencia de la topoisomerasa II $\alpha$ , se expresa en todos los tejidos y su expresión es independiente del ciclo celular. La misma está involucrada en la diferenciación celular temprana<sup>27</sup>.

La topoisomerasa II $\alpha$  humana es un homodímero de 170kDa, que contiene 1531 aminoácidos (aa), mientras que la topoisomerasa II $\beta$  es un homodímero de 180kDa y contiene 1626aa. La estructura primaria de ambas enzimas consiste en tres regiones diferentes, un dominio ATPasa N-terminal, un dominio de unión/corte al ADN que es el núcleo catalítico central, y un dominio C-terminal (figura 1.3.7)<sup>27</sup>.

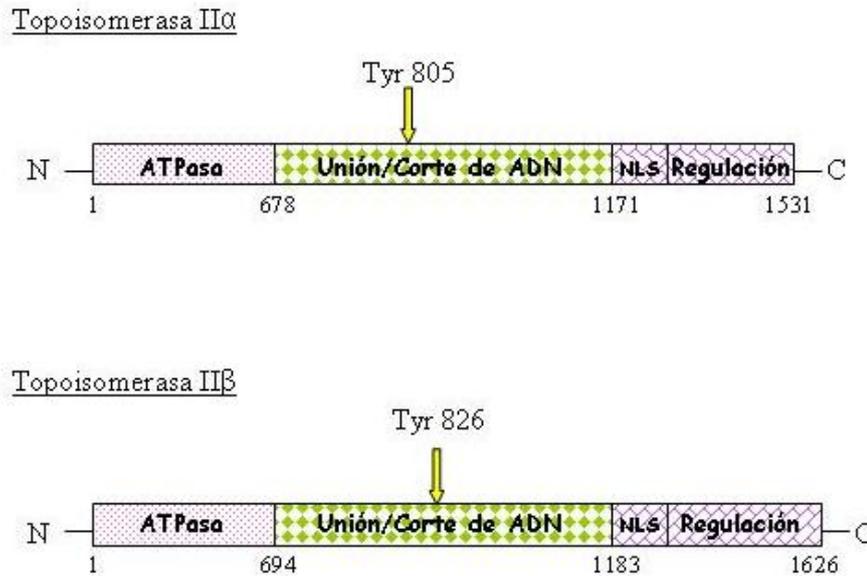


Figura 1.3.7- Estructura primaria de los dominios de ambas isoformas de la enzima topoisomerasa II $\alpha$  y topoisomerasa II $\beta$ . Las mismas poseen tres dominios; un dominio N-terminal ATPasa, un dominio de unión/corte de ADN que contiene a la tirosina del sitio activo, y un dominio C-terminal que contiene NLS (señales de localización nuclear) y sitios de regulación<sup>27</sup>.

El dominio ATPasa N-terminal contiene el sitio de unión e hidrólisis del ATP. El núcleo catalítico central contiene a la tirosina del sitio activo, y es el responsable de la unión y corte/religación del ADN. En la topoisomerasa II $\alpha$ , la tirosina del sitio activo se encuentra en la posición 805, mientras que en la topoisomerasa II $\beta$  la misma se encuentra en la posición 826. Estos dos dominios presentan una homología importante entre las dos isoformas de la enzima, y participan directamente en la catálisis. Sin embargo, el dominio C-terminal, es el dominio más variable y no es necesario para la catálisis. Este contiene señales de localización nuclear y está sujeto a modificaciones covalentes, como la fosforilación; estas modificaciones pueden ser importantes para la modulación de la actividad biológica de ambas isoformas de la enzima (figura 1.3.7)<sup>27</sup>.

### Mecanismo de acción

Las enzimas topoisomerasa II relajan superenrollamientos positivos y negativos<sup>27</sup>. Lo llevan a cabo mediante el corte y la apertura de una doble hebra de ADN, permitiendo el pasaje de otra doble hebra por el corte, religando las hebras cortadas al final<sup>37</sup>. El corte de las hebras de ADN se realiza mediante una reacción de transesterificación, en donde las tirosinas presentes en cada sitio activo de ambos monómeros, atacan a un fosfato presente en cada hebra de ADN,

separados por cuatro pares de bases. En este proceso el oxígeno fenólico de la tirosina, se une mediante un enlace covalente transitorio al fosfato 5'-terminal del ADN (ocurre en ambas hebras), dejando libre un par de grupos hidroxilo en los fosfatos 3'<sup>27,37</sup> (figura 1.3.8). Los cortes realizados en las hebras se sellan por medio de una segunda reacción de transesterificación, en donde los grupos hidroxilo de los fosfatos 3'-terminal del ADN que quedaron libres cuando se realizó el corte, atacan nucleofílicamente al átomo de fósforo unido a la tirosina, recomponiendo el enlace fosfodiéster del ADN<sup>27</sup>.

La ADN topoisomerasa II requiere de iones metálicos divalentes ( $Mg^{++}$ )<sup>30</sup>, también requiere de la unión e hidrólisis del ATP. Lo mismo es necesario para que se de el pasaje de la doble hebra de ADN a través del corte, y para que la enzima sufra un cambio conformacional que le permita comenzar un nuevo ciclo de catálisis. La unión del ATP no se necesita para la reacción de corte<sup>27</sup>.

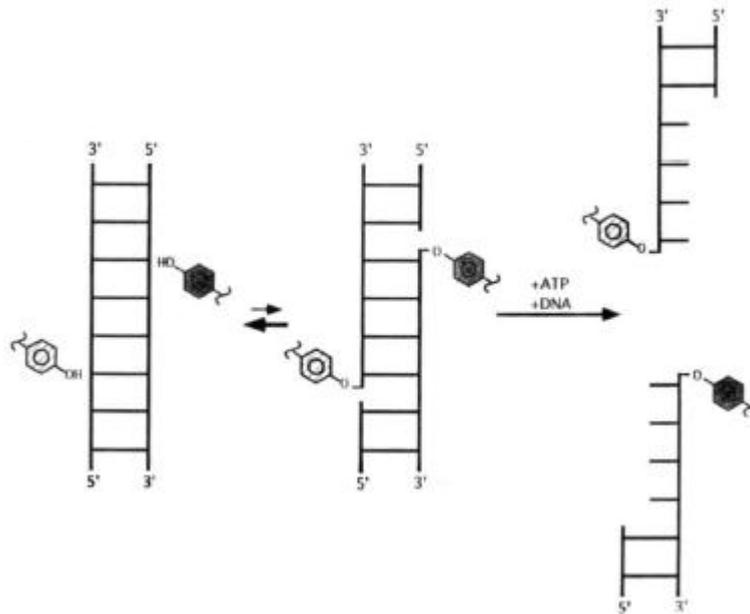


Figura 1.3.8- Se muestra la reacción de corte del ADN. La tirosina del sitio activo y el ADN están en un equilibrio entre los estados de corte de las hebras y de no corte. La unión del ATP y otro dúplex de ADN, provoca la translocación de ambas hebras unidas a las tirosinas, las cuales se alejan abriendo una compuerta, para que pase el dúplex de ADN<sup>37</sup>.

#### 1.4- Inhibidores de ADN topoisomerasas I

Se ha observado que en determinados tumores sólidos hay niveles elevados de la enzima topoisomerasa I. A pesar de que todos los tipos de células expresan la topoisomerasa I, como los niveles de la enzima no cambian con el ciclo celular, los mismos son bajos en células

normales no proliferativas, de allí resulta su citotoxicidad selectiva hacia las células tumorales. Los niveles elevados de la enzima en estas células, podrían explicarse como un aumento en la transcripción del gen de la topoisomerasa I y/o una mayor estabilidad de la ARNm que codifica para dicha enzima<sup>38</sup>.

Mecanismo de acción de los inhibidores de ADN topoisomerasa I

Los inhibidores de la topoisomerasa I pueden ser agrupados en dos clases, los venenos de la topoisomerasa I o los inhibidores catalíticos de dicha enzima. Los venenos actúan atrapando al complejo de corte, forman un complejo ternario enzima-ADN-fármaco que bloquea la religación de la hebra, la cual permanece unida a la enzima<sup>28,39</sup> (figura 1.4.1). En general, la mayoría de los inhibidores que se conocen hasta el momento actúan como venenos de la topoisomerasa I<sup>39</sup>.

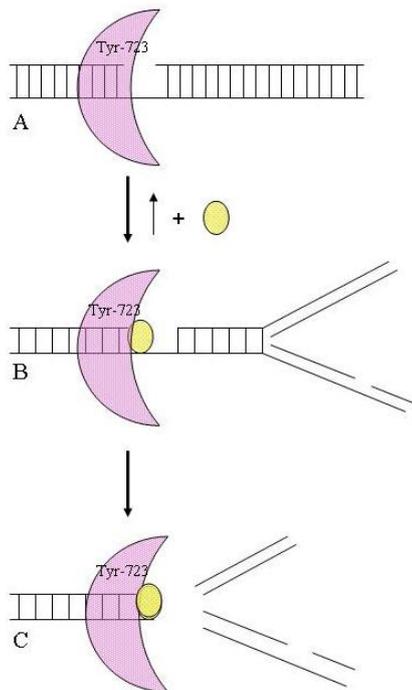


Figura 1.4.1- Mecanismo de acción de los venenos de la topoisomerasa I. A- La enzima (rosado) relaja normalmente al ADN superenrollado, formando un enlace covalente entre la tirosina-723 y el extremo 3'terminal del ADN. B-La adición del veneno (amarillo) resulta en la formación de un complejo ternario y bloquea la religación del ADN. C- La colisión entre la horquilla de replicación que avanza con el complejo ternario, lleva al daño en el ADN y a la muerte celular Adaptado de Topoisomerase-interacting agents<sup>28</sup>.

Fármacos de uso en clínica

Los únicos inhibidores de la topoisomerasa I que se encuentran en uso clínico son los derivados del producto natural camptotecina (figura 1.4.2). Camptotecina es un alcaloide quinolínico ópticamente activo extraído del árbol chino *Camptotheca acuminata*, con propiedades antitumorales<sup>40</sup>. En los años 80, se determinó que el único blanco molecular de la

camptotecina es la topoisomerasa I<sup>41</sup>. La sensibilidad de las células al fármaco depende de los niveles de la enzima, esto sucede en general para todos los venenos de la topoisomerasa I. En consecuencia, la reducción de la actividad de la topoisomerasa I es la causa más común de resistencia a estos fármacos<sup>39</sup>.

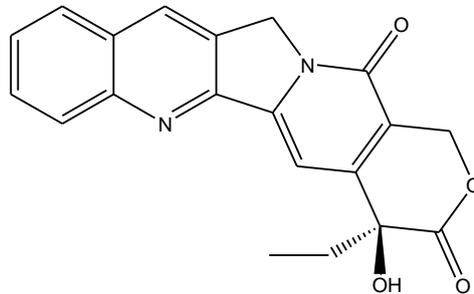


Figura 1.4.2- Estructura de camptotecina.

Dada la alta toxicidad que presenta la camptotecina, la misma no puede ser utilizada como un antitumoral. Por este motivo, se han desarrollado derivados de camptotecina, que son utilizados actualmente en la clínica, los cuales presentan mejor solubilidad y menor toxicidad<sup>41</sup>.

La camptotecina es una molécula plana, la cual no se intercala en el ADN<sup>39</sup>. Se une en la interfase del complejo topoisomerasa I-ADN, intercalándose en el sitio de corte, interactuando mediante fuerzas hidrofóbicas por apilamiento de tipo  $\pi$  (figura 1.4.3). Además forma enlaces de hidrógeno con tres residuos de la topoisomerasa I (figura 1.4.4).

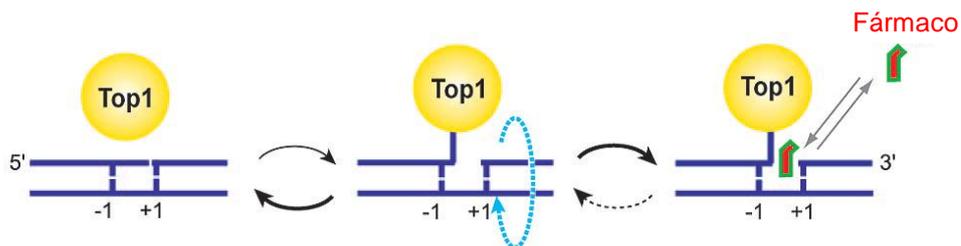


Figura 1.4.3- Se observa como el fármaco se intercala en la interfase de la topoisomerasa I-ADN, formando el complejo ternario, bloqueando la religación de la hebra de ADN cortada<sup>40</sup>.

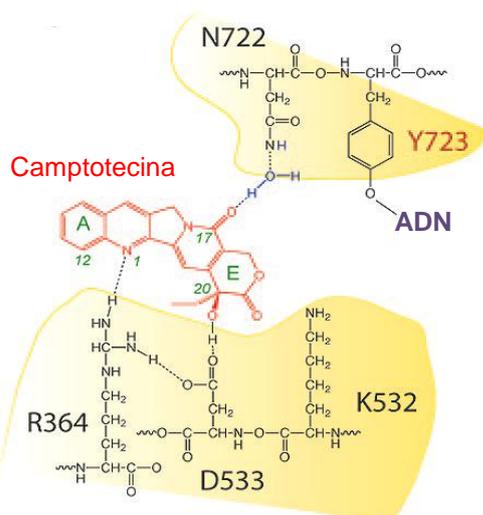


Figura 1.4.4- Enlaces de hidrógeno entre la camptotecina y los aminoácidos de la ADN topoisomerasa I<sup>40</sup>.

Derivados de la camptotecina.

Actualmente, dos derivados de la camptotecina, Topotecan e Irinotecan<sup>40,42</sup>, están aprobados clínicamente y presentan mayor solubilidad que la misma. El primero se utiliza en cáncer de ovario y de pulmón, difiere de la camptotecina en los grupos hidroxilo y dimetilamino en el anillo A, lo que le confiere un aumento en la solubilidad y minimiza su citotoxicidad<sup>41</sup> (figura 1.4.5). Interacciona con el complejo ADN- topoisomerasa I de la misma manera que la camptotecina, como se observa en la figura 1.4.6<sup>41</sup>.

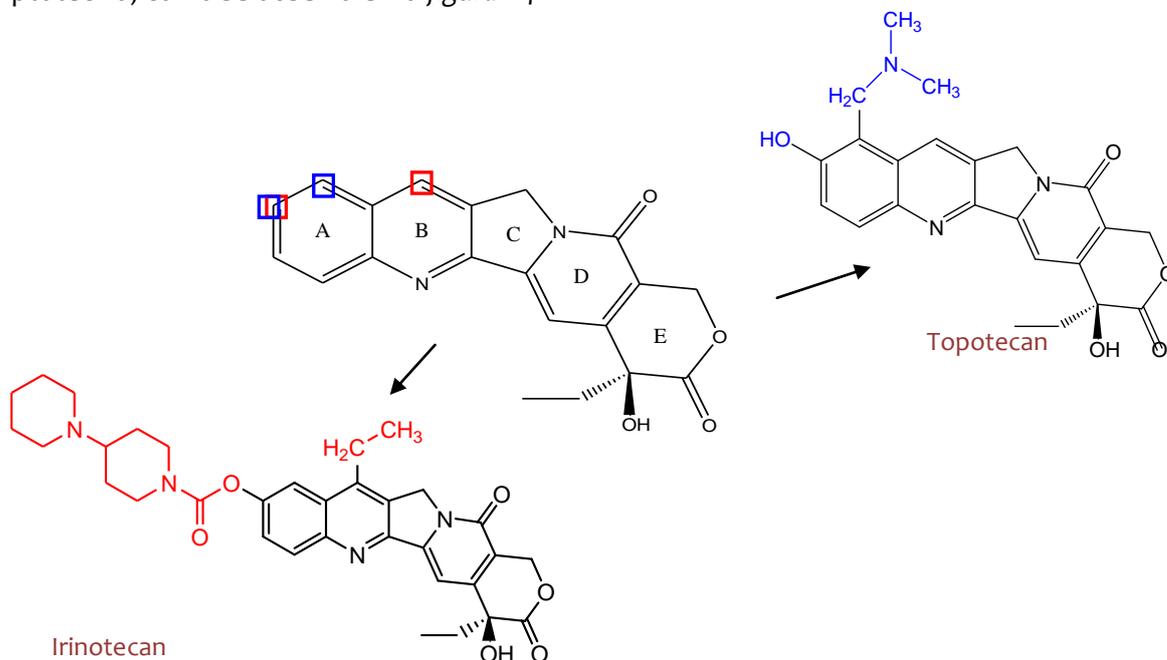


Figura 1.4.5- Estructura de camptotecina con sus derivados Topotecan e Irinotecan, los cuales se encuentran actualmente en uso clínico. Los recuadros en azul (anillo A) indican la posición de las modificaciones estructurales del Topotecan con respecto a la camptotecina. Los recuadros en rojo (anillo A y B) indican la posición de las modificaciones estructurales del Irinotecan con respecto a la camptotecina.

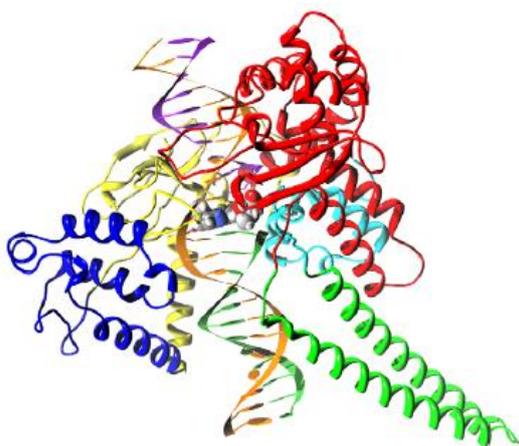


Figura 1.4.6- Estructura tridimensional del complejo ternario ADN-topoisomerasa I humana- Topotecan. Las hebras del ADN están coloreadas en naranja (hebra que no es cortada), violeta (hebra cortada corriente arriba), y verde (hebra cortada corriente abajo). La molécula de topotecan se representa mediante radios de Van Der Waals, y los diferentes colores representan diferentes átomos<sup>41</sup>.

El irinotecan es un profármaco que se utiliza en tumores de colón, difiere de la camptotecina en los grupos bis-piperidina y etilo en los anillos A y B respectivamente (figura 1.4.5). Este profármaco necesita ser convertido a su metabolito activo SN-38 por la carboxilesterasa (figura 1.4.7)<sup>40</sup>.

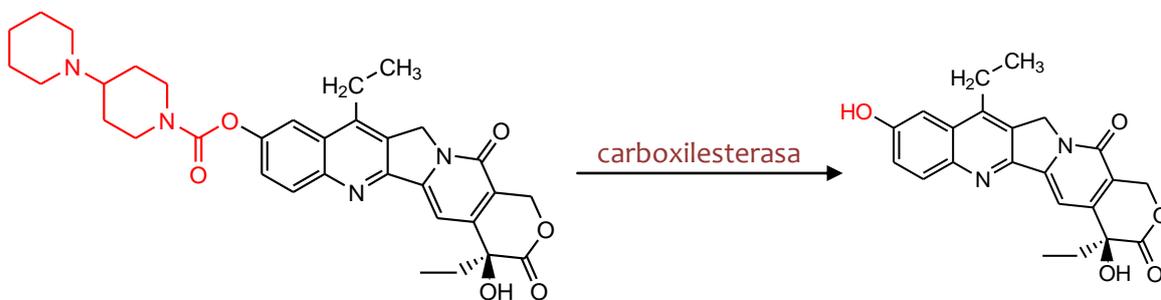


Figura 1.4.7- Metabolización de irinotecan a SN-38<sup>40</sup>.

Nuevos derivados de la camptotecina están en pruebas clínicas, los mismos se observan en la figura 1.4.8<sup>40</sup>.

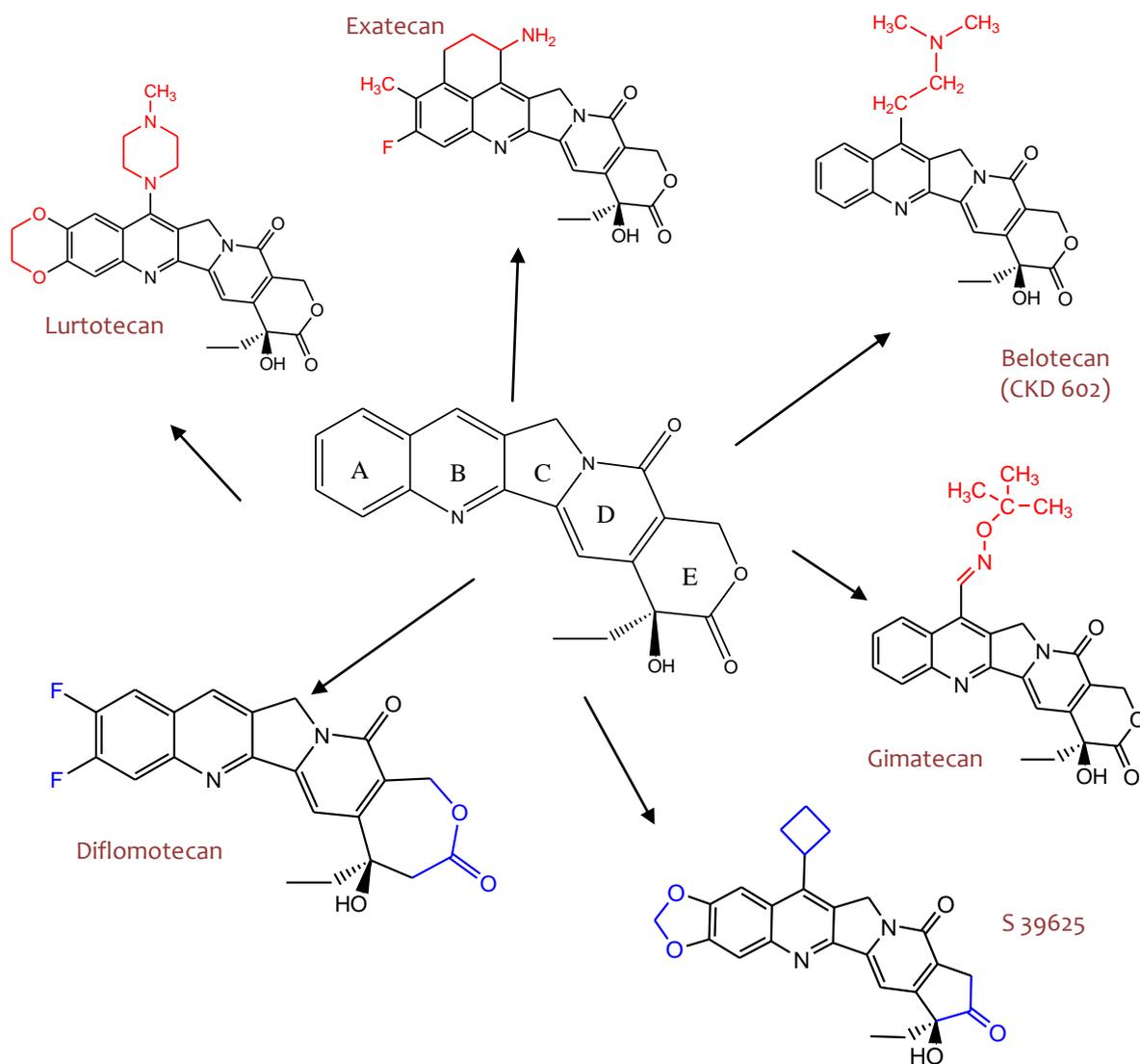


Figura 1.4.8- Derivados de la camptotecina que se encuentran en pruebas clínicas. En rojo se identifican las modificaciones de los derivados con la camptotecina. En azul se identifican las modificaciones de las homocamptotecinas, estas modificaciones incluyen cambios en el anillo-E<sup>40</sup>.

Los derivados de la camptotecina presentan varias limitaciones. Los mismos son químicamente inestables inactivándose rápidamente, por la apertura del anillo-E, por lo cual pasan de su forma lactona activa a carboxilato inactivo (figura 1.4.9). Esta reacción es reversible, pero el equilibrio favorece la forma carboxilato a pH fisiológico. Además los derivados activos son rápidamente depletados en la circulación sanguínea, dada la alta afinidad de unión entre el carboxilato y la albúmina sérica.

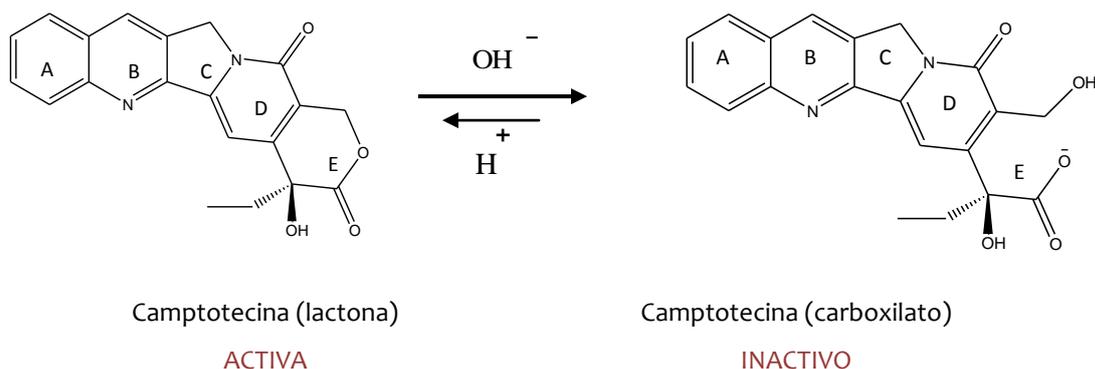


Figura 1.4.9- Se observa el equilibrio entre la forma lactona activa y la forma carboxilato inactiva<sup>40</sup>.

Con el fin de lograr una mayor estabilidad del anillo-E se han sintetizado las homocamptotecinas. Estas moléculas son derivados de la camptotecina que tienen modificado el anillo-E (figura 1.4.8)<sup>40</sup>. Diflomotecan y S39625 son ejemplos de homocamptotecinas. Estas moléculas presentan una citotoxicidad similar a la camptotecina, y presentan la ventaja de generar menor resistencia en las células que expresan los transportadores de flujo de salida ABCG2.

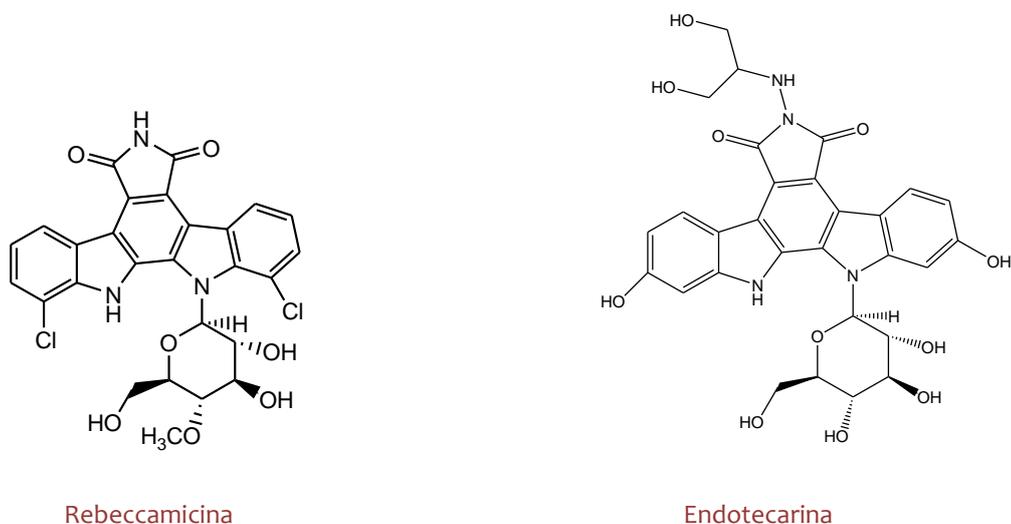
Además de ser químicamente inestables, los derivados de la camptotecina presentan otras limitaciones. Los tiempos de exposición a estas moléculas deben ser largos, ya que una vez que el fármaco se remueve de su sitio de acción, se revierte la inactividad del complejo de corte. Además las células que sobreexpresan transportadores de membrana ABCG2 y ABCB1, que son transportadores de flujo de salida, presentan resistencia a estos derivados. Por último, estos derivados presentan muchos efectos secundarios importantes que limitan la dosis a administrar. Por este motivo se han desarrollado nuevos fármacos no derivados de la camptotecina<sup>40</sup>.

#### Fármacos en desarrollo, no derivados de la camptotecina

Otras tres familias de compuestos inhibidores de la enzima topoisomerasa I han alcanzado desarrollo clínico, indolcarbazoles, indenoisoquinolinas, y derivados de fenantridinas<sup>40, 42</sup>.

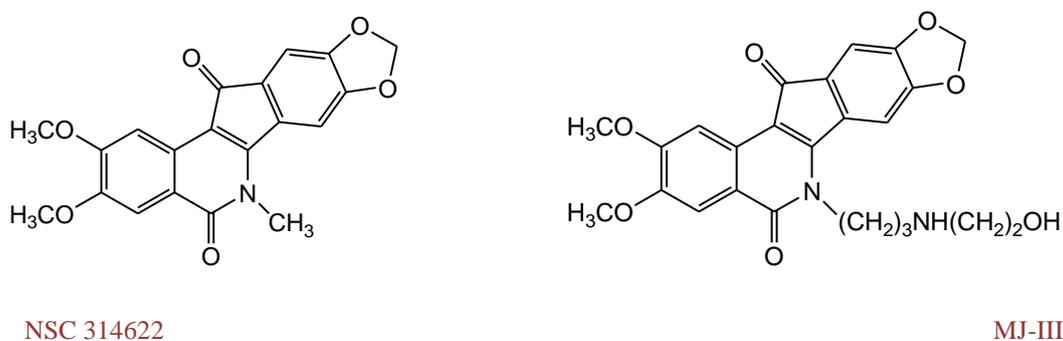
Los indolcarbazoles son alcaloides bis-indólicos aislados predominantemente de diferentes bacterias, los mismos presentan actividad antitumoral únicamente a través de la inhibición de la topoisomerasa I. Uno de los primeros indolcarbazoles que mostró actividad antiproliferativa a través de la inhibición selectiva de la enzima es la rebeccamicina (figura

1.4.10). Se han sintetizado varios indolocarbazoles, actualmente la endotecarina (*figura 1.4.10*) ha finalizado la fase III de pruebas clínicas<sup>43</sup>.



*Figura 1.4.10-* Se observan dos derivados de indolocarbazoles, la rebeccamicina y la endotecarina<sup>43</sup>.

Las indenoisoquinolinas (*figura 1.4.11*) inhiben a la topoisomerasa I, mediante un mecanismo de acción como el de la camptotecina, inhiben la reacción de religación uniéndose en la interfase topoisomerasa I-ADN, intercalándose en el sitio de corte<sup>40</sup>. Estas moléculas presentan ventajas con respecto a los derivados de la camptotecina, ya que mejoran las limitaciones que presentaban los mismos. Las indenoisoquinolinas son químicamente estables, la inactividad del complejo de corte se revierte más lentamente que cuando es inactivado por la camptotecina y tienen elevada actividad antiproliferativa. Dos compuestos, el indotecan y el indimitecan (*figura 1.4.11*) se encuentran en fase I de pruebas clínicas<sup>43</sup>. Además estas dos moléculas no son sustratos de los transportadores de membrana ABC<sup>40</sup>.



*Figura 1.4.11-* Estructura de los diferentes derivados de las indenoisoquinolinas<sup>40,43</sup>.

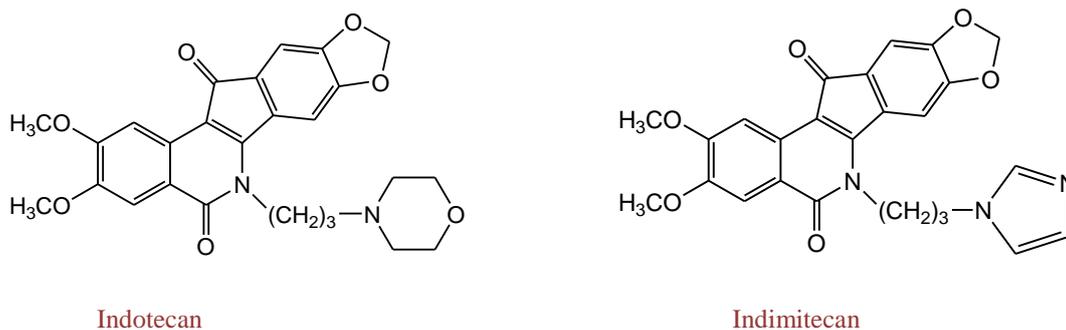


Figura 1.4.11- Estructura de los diferentes derivados de las indenoisoquinolinas<sup>40,43</sup>.

Arc-111 (figura 1.4.12) es un derivado de las fenantridinas<sup>40</sup> que presenta actividad antitumoral, y se vio que presenta niveles de actividad similares a la camptotecina<sup>44</sup>. Estos derivados presenta ventajas similares a las de las indenoisoquinolinas frente a las camptotecinas<sup>40,44</sup>.

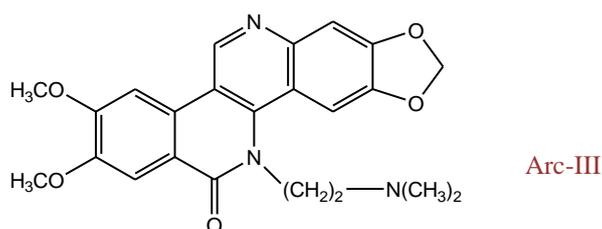


Figura 1.4.12- Arc-III, derivado de fenantridinas<sup>40,44</sup>.

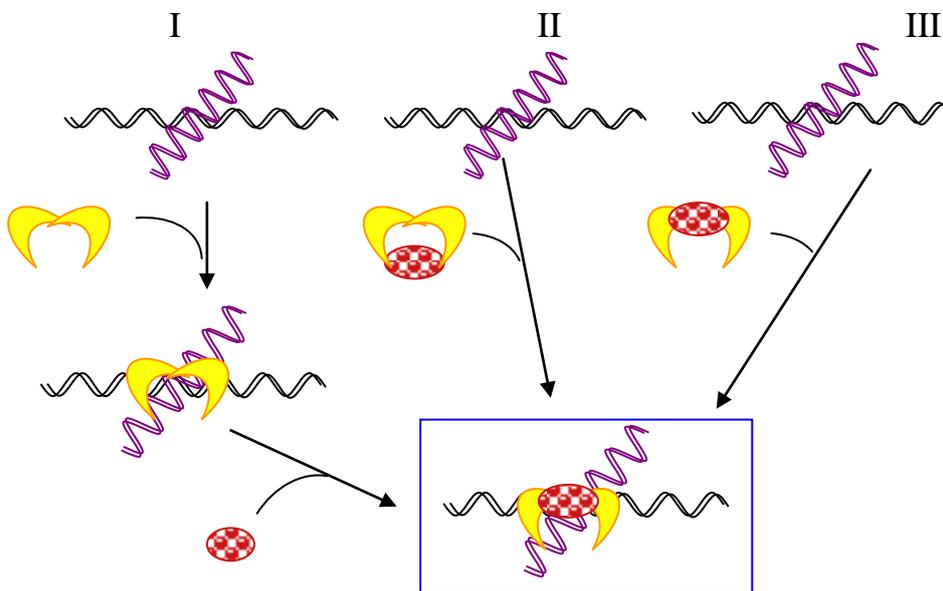
### 1.5- Inhibidores de ADN topoisomerasa II

La enzima topoisomerasa II es un blanco molecular ideal para la quimioterapia, ya que participa en la modulación del ADN en muchos eventos metabólicos, que están frecuentemente alterados en las células tumorales<sup>27</sup>. La actividad de la topoisomerasa II de relajar el superenrollamiento por el corte, pasaje y religación de las hebras del ADN, puede considerarse una potencial causa de toxicidad, ya que si la religación de las hebras falla, la célula puede dirigirse hacia la muerte celular<sup>45</sup>. Los fármacos que tienen como blanco a esta enzima, son utilizados ampliamente en clínica para el tratamiento de diferentes tipos de cáncer<sup>27</sup>.

### Mecanismo de acción de los inhibidores de la topoisomerasa II

Los fármacos que tienen como blanco a esta enzima, como en el caso de los inhibidores de la topoisomerasa I se dividen en dos clases, los venenos de la topoisomerasa (*figura 1.5.1, I y II*) y los inhibidores catalíticos de la misma (*figura 1.5.1, III*). Los venenos de la topoisomerasa II actúan estabilizando el complejo de corte ADN-topoisomerasa II, que se forma durante el ciclo catalítico, impidiendo la religación de las hebras cortadas. Los inhibidores catalíticos inhiben la actividad de la enzima en otros puntos del ciclo catalítico<sup>27</sup>.

Los venenos de la topoisomerasa II se clasifican en intercalantes (*figura 1.5.1, I*) y no intercalantes (*figura 1.5.1, II*). El mecanismo propuesto para los venenos intercalantes, es que pueden unirse en la interfase del complejo de corte por un mecanismo similar al de la camptotecina y ADN topoisomerasa I, en donde el fármaco se intercala entre la base +1 y -1 del complejo ternario, distorsionando la geometría requerida para la religación. El mecanismo propuesto para los venenos no intercalantes, es que forman inicialmente un complejo binario fármaco-topoisomerasa II, que es importante para que el fármaco se ubique en el sitio adecuado para que pueda bloquear al complejo ternario<sup>46</sup>.



*Figura 1.5.1- Mecanismo de acción propuestos para los inhibidores de la ADN topoisomerasa II. I y II representan el mecanismo propuesto para los inhibidores que actúan como venenos de la topoisomerasa II, intercalantes y no intercalantes respectivamente. III representa el mecanismo de acción de los inhibidores catalíticos de la enzima.*



Las antraciclinas presentan varias limitaciones, una de ellas es que interacciona con el ADN de muchas formas, generando daño en el mismo mediante mecanismos que no involucran a la enzima topoisomerasa II, los cuales generan citotoxicidad. También generan cardiotoxicidad, por lo que la dosis a administrar está limitada. Además es sustrato de la glicoproteína-P, lo que genera resistencia al fármaco<sup>28,47</sup>.

Estas limitaciones promovieron la búsqueda de otros compuestos alternativos, así surge el voreloxin (AG-7352) (figura 1.5.3), un derivado de las quinolonas, el cual no presenta actividad antibiótica pero tiene una importante actividad antitumoral. Este compuesto es un veneno intercalante de la topoisomerasa II. Presenta ventajas con respecto a las antraciclinas. Este derivado no es sustrato de la glicoproteína-P, por lo tanto no presenta resistencia en las células que la sobreexpresan; presenta menos toxicidad ya que su núcleo de quinolona es químicamente menos reactivo, no generando especies reactivas del oxígeno de forma significativa, e induce cortes selectivos en el ADN mediados por la topoisomerasa II humana  $\alpha$  y  $\beta$ . Este compuesto se encuentra en fase II de pruebas clínicas para la leucemia mieloide aguda y el cáncer de ovario resistente al cis-platino<sup>47</sup>.

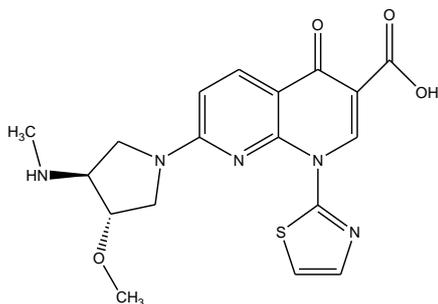


Figura 1.5.3- Estructura del voreloxin.

#### Derivados de antracenodionas

En busca de análogos de antraciclinas, que tuviesen menor toxicidad cardíaca, se sintetizó en 1970 la mitoxantrona. Esta molécula es el único derivado de las antracenodionas aprobado por la FDA. La mitoxantrona es intercalante del ADN y actúa como veneno intercalante de la topoisomerasa II (figura 1.5.4)<sup>28</sup>.

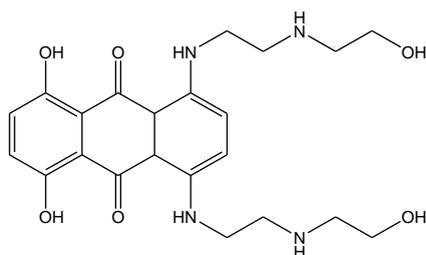


Figura 1.5.4- Estructura de la mitoxantrona.

### Derivados de las epipodofilotoxinas

Las epipodofilotoxinas son derivados glicosilados de las podofilotoxinas, extraídos de la planta Mandrake. Estas moléculas tienen actividad antimicrotubular, pero además dos de ellas presentan actividad antitopoisomerasa II, estas son el tenipósido y el etopósido (figura 1.5.5)<sup>28</sup>. Estas moléculas actúan como venenos no intercalantes de la topoisomerasa II<sup>28</sup>, debido a que interactúan débilmente con el ADN<sup>46</sup>.

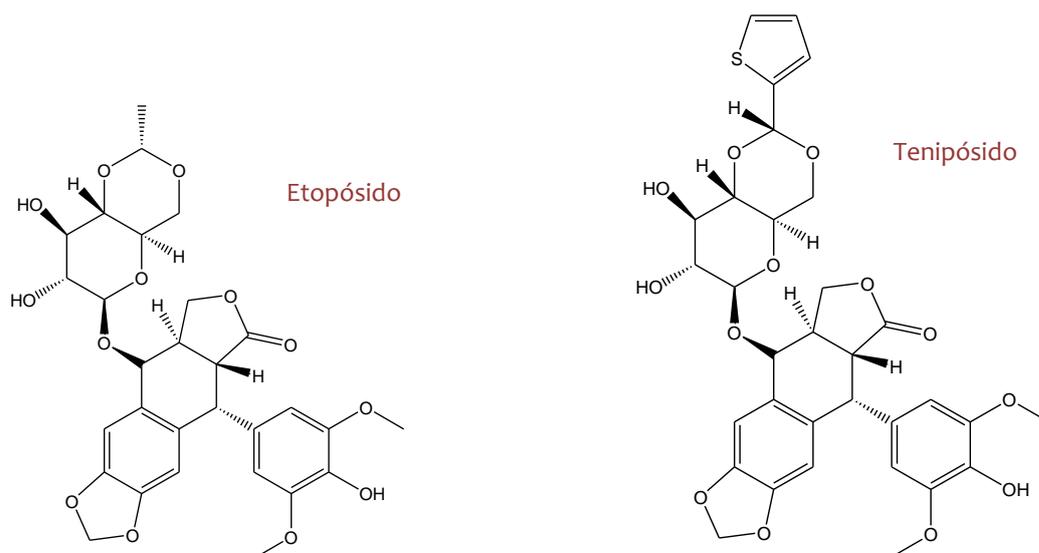


Figura 1.5.5- Estructura del etopósido y del tenipósido.

El etopósido es uno de los agentes quimioterápicos más utilizados en los diferentes tipos de cáncer humano<sup>48</sup>. Se ha determinado la estructura cristalográfica del complejo ternario ADN-núcleo catalítico central de la topoisomerasa II $\beta$ - etopósido (figura 1.5.6). También se han identificado los residuos de la ADN topoisomerasa II $\beta$  que interactúan con el etopósido, (figura 1.5.7)<sup>45</sup>.

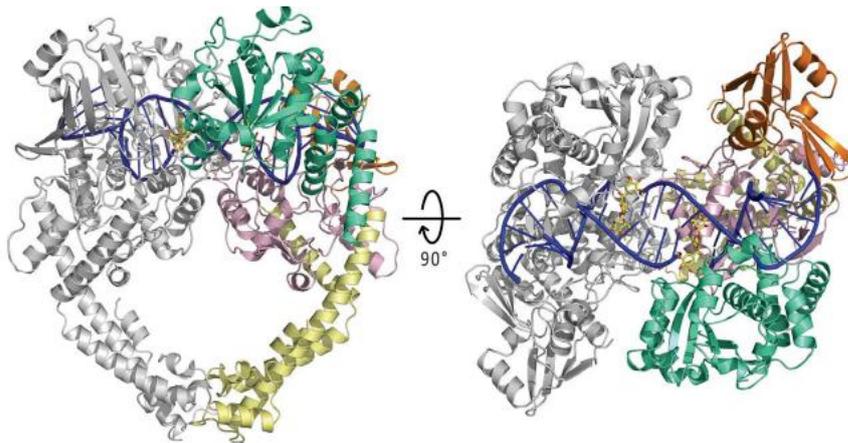


Figura 1.5.6- Vistas ortogonales del complejo ternario<sup>45</sup>.

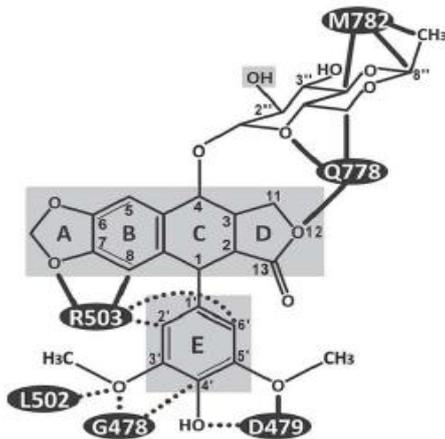


Figura 1.5.7- Se observan los residuos de la enzima que interaccionan con el etopósido. Los átomos marcados en el recuadro gris interaccionan con el ADN<sup>45</sup>.

El etopósido en los humanos puede ser metabolizado por varias vías, como indica la *figura 1.5.8*. Se descubrió que los metabolitos catecol y quinona del etopósido presentan actividad antitopoisomerasa II $\alpha$ . La actividad antitopoisomerasa II $\alpha$  del metabolito quinona es varias veces mayor que la del etopósido. Sin embargo, está asociado con la generación de efectos secundarios, como la generación de leucemia en 2-3% de los pacientes tratados con etopósido<sup>49</sup>.

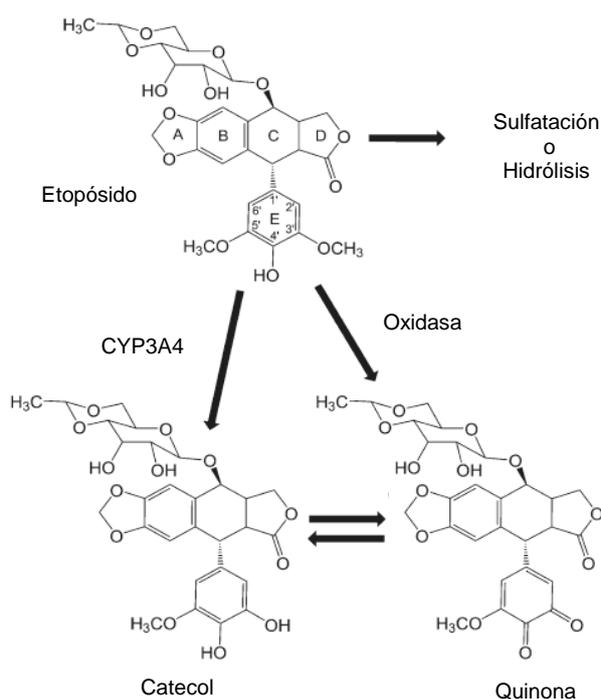


Figura 1.5.8- Metabolismo del etopósido<sup>49</sup>.

### Profármacos selectivos en hipoxia inhibidores de topoisomerasa II

Como se mencionó anteriormente en la página 7 (sección 1.2), los profármacos selectivos en hipoxia son reducidos por enzimas óxido-reductasas presentes en las células, generando radicales o especies citotóxicas. Esta bio-reducción es revertida en presencia de  $O_2$ <sup>7</sup>. Tirapazamina y AQ4N son ejemplos de profármacos cuya bio-reducción genera además de radicales citotóxicos, moléculas inhibidoras de la enzima topoisomerasa II.

Tirapazamina es un derivado de N-óxido de aminas heterocíclicas aromáticas. Es el profármaco de un veneno no intercalante de la topoisomerasa II, que actúa estabilizando el complejo de corte ADN-topoisomerasa II<sup>22</sup>. La forma activa se obtiene a partir de la reducción vía un electrón de sus grupos N-óxido<sup>7</sup> (figura 1.5.9).

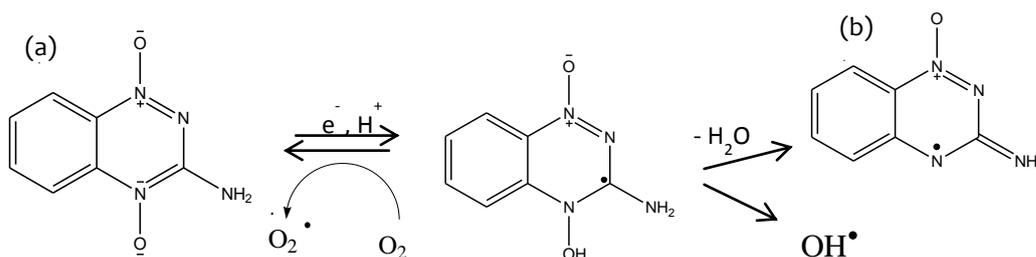


Figura 1.5.9- Mecanismo de acción de Tirapazamina. (a)- profármaco, (b)- veneno no intercalante de topoisomerasa II. Adaptado de referencia 7.

AQ4N es un derivado antraquinona que posee en su estructura N-óxido de aminas alifáticas<sup>55</sup>. La forma activa de este profármaco, AQ4, se obtiene por la reducción de sus grupos N-óxido vía dos electrones. AQ4 posee alta afinidad por el ADN, y es un veneno intercalante de la topoisomerasa II<sup>7,50</sup> (figura 1.5.10).

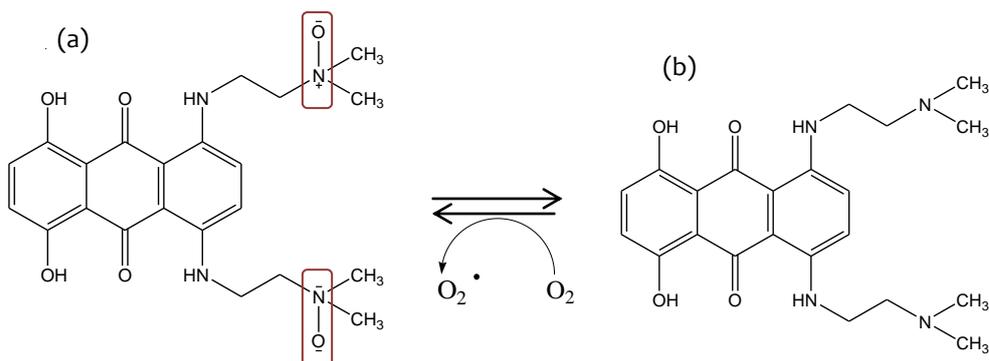


Figura 1.5.10- Mecanismo de acción de AQ4N. (a)- AQ4N, en recuadros rojos se señalan los grupos N-óxido (b)- AQ4, potente intercalante del ADN y veneno de topoisomerasa II. Adaptado de referencia 7.

### Inhibidores catalíticos

Los inhibidores catalíticos de la topoisomerasa II son utilizados con menos frecuencia como agentes antitumorales. Estos compuestos tienen mecanismos de acción heterogéneos e inhiben a la enzima por diferentes vías. Los mismos presentan otros blancos moleculares además de la topoisomerasa II<sup>27</sup>.

Entre los fármacos inhibidores de la enzima se encuentran, aquellos que impiden la unión de la topoisomerasa II al ADN, como la aclarubicina (un intercalante del ADN, figura 1.5.11) y la suramina. Los fármacos cuyo mecanismo de acción es bloquear el sitio de unión al ATP, como

novobiocina (figura 1.5.11) y la salvicina. Luego hay fármacos como la merbarona (figura 1.5.11) que inhibe que la enzima realice el corte sobre el ADN; y los derivados de bisdiazopiperazinas, como ICRF-154, ICRF-187 y ICRF-193 (figura 1.5.11) que atrapan a la topoisomerasa II en un complejo cerrado, el cual no puede participar de un nuevo ciclo catalítico<sup>27, 46</sup>.

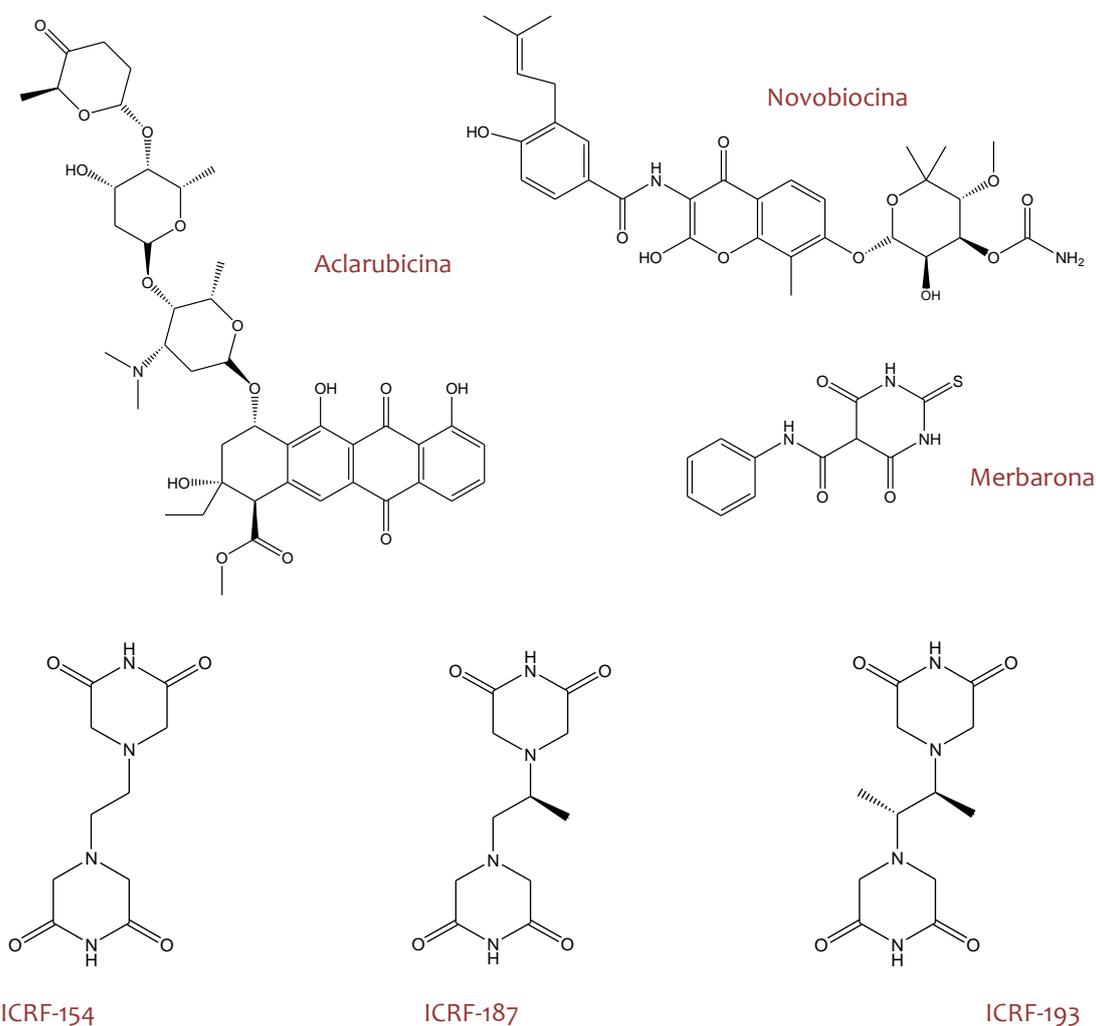


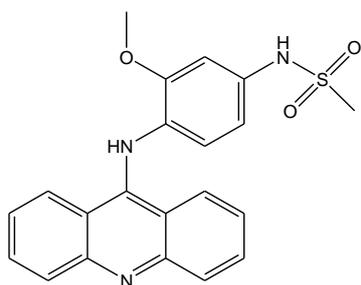
Figura 1.5.11- Estructura de algunos inhibidores catalíticos de la ADN topoisomerasa II.

### 1.6- Inhibidores mixtos

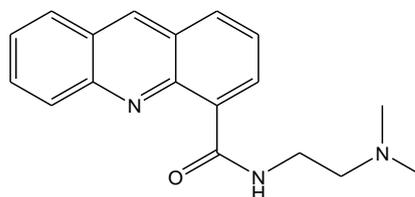
Los inhibidores mixtos de la topoisomerasa son compuestos que inhiben tanto a la topoisomerasa I como a la topoisomerasa II. Entre estos compuestos se encuentran los derivados de acridina<sup>51</sup> y los derivados de fenazina<sup>52</sup>.

### Derivados de acridina

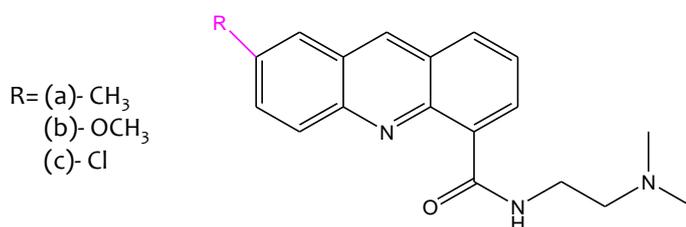
Los derivados de acridina son venenos intercalantes del ADN<sup>46, 51</sup>. Estos derivados tienen relevancia clínica, en particular la amsacrina (figura 1.6.1)<sup>53</sup>. Otro derivado, el N-[2-(dimetilamino)etil]-acridina-4-carboxamida, conocido como DACA (figura 1.6.1), se encuentra en ensayos clínicos. A partir de este derivado se han realizado diferentes modificaciones estructurales a nivel de los anillos aromáticos que dieron lugar a compuestos más citotóxicos, siendo el derivado (b) un inhibidor de la topoisomerasa I aproximadamente cuatro veces más potente<sup>51</sup>.



Amsacrina



DACA



Derivados de DACA

Figura 1.6.1- Derivados de acridina.

### Derivados de fenazina

Otros compuestos que demostraron que pueden estabilizar al complejo de corte tanto de la topoisomerasa I, como de la topoisomerasa II, catalogándose como inhibidores mixtos de la topoisomerasa, son los derivados de fenazina. Los derivados XR11576 y XR5944 (figura 1.6.2) demostraron tener potente actividad citotóxica en varios modelos tumorales *in vitro* e *in vivo*<sup>52</sup>.

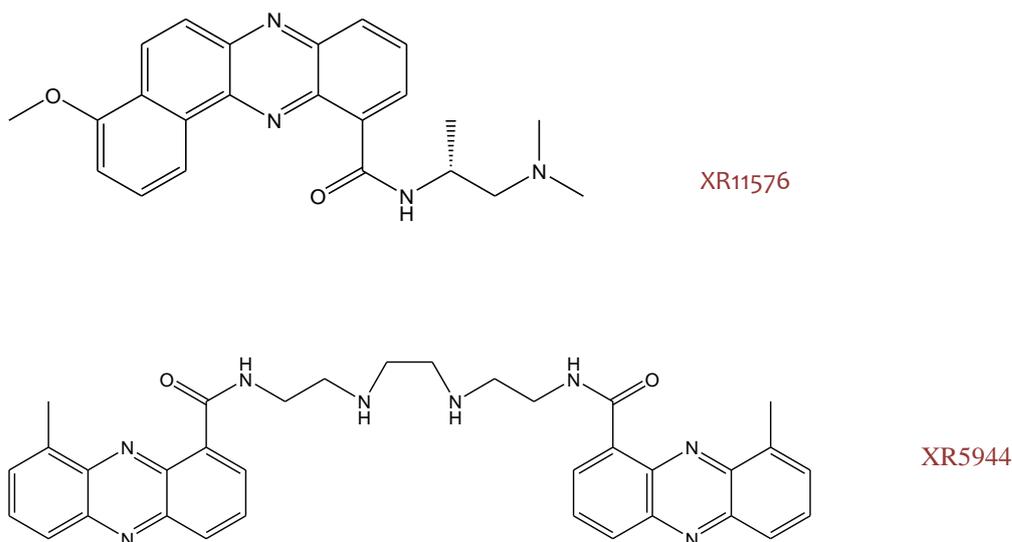


Figura 1.6.2- Derivados de fenazina

### 1.7- Modelos de estudio de inhibición de topoisomerasa mediante el uso de levaduras

Las levaduras son eucariotas inferiores, son hongos unicelulares, cuya división es en general por gemación. Fue el primer eucariota cuyo genoma se secuenció por primera vez<sup>54</sup>. Estos organismos unicelulares son capaces de llevar a cabo dos tipos de metabolismos opuestos, la fermentación y la respiración<sup>55</sup>. La levadura más conocida es *Saccharomyces cerevisiae*<sup>54</sup>, la misma es industrialmente importante y es modelo de muchos estudios bioquímicos y genéticos<sup>56</sup>.

La levadura *S. cerevisiae* habita originalmente en frutas y jugos de frutas, pero las levaduras comerciales son muy diferentes de su ancestro silvestre, ya que han sido manipuladas por el hombre durante los últimos años<sup>54</sup>. Por este motivo han tenido en su evolución, cambios metabólicos dependiendo de su origen. Las levaduras de laboratorio se reproducen rápidamente en la fase de fermentación, tienen un tamaño pequeño, y se reproducen poco en fase de respiración. Estos organismos sufren un cambio diáuxico en un medio con 1% de glucosa. Los mismos tienen una primera fase de crecimiento en fermentación, donde producen etanol; luego cambian su metabolismo a una fase de respiración en donde utilizan el etanol como fuente de carbono. La fase de fermentación presenta un ambiente reductor, mientras que la fase de respiración presenta un ambiente oxidativo. Este cambio diáuxico, en general no ocurre en un medio con 15% de glucosa<sup>57</sup>.

Como se mencionó anteriormente la levadura *S. cerevisiae* es modelo de muchos estudios bioquímicos y genéticos<sup>56</sup>. Mortimer fue el creador del Yeast genetic stock center, en donde se han desarrollado diversas cepas de levaduras para realizar investigaciones con diferentes fines<sup>58,59</sup>. Otros investigadores como Nitiss y colaboradores desarrollaron un sistema utilizando a la levadura *Saccharomyces cerevisiae* para el estudio de fármacos anti-topoisomerasa II<sup>60</sup>. Estudios previos de fármacos anti-topoisomerasa I utilizan una cepa de levadura mutante que no expresa a la topoisomerasa I. De esta manera se pudo demostrar que el blanco más importante de la camptotecina es esta enzima. En el caso de la topoisomerasa II no se puede utilizar el mismo modelo de cepas de levaduras mutantes, que carezcan de la expresión de la topoisomerasa II, ya que esta enzima es esencial para la viabilidad celular. Por este motivo se creó un mutante de levadura que lleva el alelo *top2-1*, el cual permite la expresión diferencial de la topoisomerasa II dependiendo de la temperatura<sup>61</sup>.

Las cepas que llevan el alelo *top2-1* crecen normalmente a 25°C (temperatura permisiva) y tienen aproximadamente una sensibilidad a los fármacos igual a la cepa salvaje. A 30°C (temperatura semipermisiva) las cepas pueden crecer pero muy lentamente, a esta temperatura son altamente resistentes a los fármacos anti-topoisomerasa II, pero no a los anti-topoisomerasa I. Esto sucede porque a 30°C la expresión de la topoisomerasa II es muy baja, de todos modos la misma es suficiente para la viabilidad celular<sup>61</sup>.

Nitiss y colaboradores transformaron levaduras generando varias cepas con diferentes mutaciones. En el siguiente trabajo se utilizaran las cepas JN362a y JN362at2-1. Estas cepas son isogénicas, la primera es la salvaje y la segunda lleva el alelo *top2-1*. Ambas cepas tienen la mutación *ISE2*, esta mutación se requiere para la permeabilidad al fármaco<sup>61</sup>.

### **Bibliografía**

- 1- Alberts, B; Bray, D; Lewis, J; Raff, M; Roberts, K; Watson, J. *Biología molecular de la célula*. 4° ed, Ediciones Omega, 2004; Barcelona, España.
- 2- Irureta, S; Touriño, C; Artagaveytia, N. *Biología del crecimiento tumoral*, en *Temas de Neoplasia*. Editor Oficina del Libro FEFMUR, 2009; Montevideo, Uruguay,
- 3- Schulz, W. *An introduction to human cancers*, en *Molecular biology of human cancers*. Springer, 2007; Dordrecht, The Netherlands.
- 4- Barquet, V; Larre, A. *Bases genéticas del cáncer*, en *Temas de Neoplasia*. Editor Oficina del Libro FEFMUR, 2009; Montevideo, Uruguay.

- 5- Song, Y; Samulski, T.D.; Van Dyke, T. Cancer: A Conceptual Framework, en *Cancer, principles and practice of oncology*. Editor DeVita, V; 8° ed, vol 1, 2008; Philadelphia, USA.
- 6- Brown, J.M.; Giaccia, A.J. The Unique Physiology of Solid Tumors: Opportunities (and Problems) for Cancer Therapy. *Cancer Research*. 58, 1408-1416, 1998.
- 7- Brown, J.M.; Wilson, W.R. Exploiting tumour hypoxia in cancer treatment. *Nature Reviews Cancer*. 4, 437-447, 2004.
- 8- Gatenby, R; Gillies, R. Why do cancer have high aerobic glycolysis? *Nature reviews cancer*. 4 (11), 891-899, 2004.
- 9- Barrios, E; Ronco, A, L. Tendencias de la mortalidad por cáncer en Uruguay 1953-1997. *Revista Médica del Uruguay*. 18, 167-174, 2002.
- 10- <http://www.urucan.org.uy>
- 11- Rosenberg, S. Surgical oncology: general issues, en *Cancer; principles and practice of oncology*. Editor DeVita, V; Lawrence, T; Rosenberg, S. 9°ed, Lippincott Williams & Wilkings, 2011; Philadelphia, USA.
- 12- Hosoya, Y; Lefor, A. Surgical oncology: laparoscopic surgery, en *Cancer; principles and practice of oncology*. Editor DeVita, V; Lawrence, T; Rosenberg, S. 9°ed, Lippincott Williams & Wilkings, 2011; Philadelphia, USA.
- 13- Morgan, M; Ten Haken, R; Lawrence, S. Radiation Oncology, en *Cancer; principles and practice of oncology*. Editor DeVita, V; Lawrence, T; Rosenberg, S. 9°ed, Lippincott Williams & Wilkings, 2011; Philadelphia, USA.
- 14- Perry, M. *The chemotherapy source book*. 3° ed, Lippincott Williams & Wilkings, 2001; Philadelphia, USA.
- 15- DeVita, V; Chu, E. Medical Oncology, en *Cancer; principles and practice of oncology*. Editor DeVita, V; Lawrence, T; Rosenberg, S. 9 ed, Lippincott Williams & Wilkings, 2011; Philadelphia, USA.
- 16- Tew, K. Alkylating Agents, en *Cancer; principles and practice of oncology*. Editor DeVita, V; Lawrence, T; Rosenberg, S. 9 ed, Lippincott Williams & Wilkings, 2011; Philadelphia, USA.
- 17- Reed, E. Platinum analogs, en *Cancer; principles and practice of oncology*. Editor DeVita, V; Lawrence, T; Rosenberg, S. 9°ed, Lippincott Williams & Wilkings, 2011; Philadelphia, USA.
- 18- Saif, W; Chu, E. Antimetabolites, en *Cancer; principles and practice of oncology*. Editor DeVita, V; Lawrence, T; Rosenberg, S. 9 ed, Lippincott Williams & Wilkings, 2011; Philadelphia, USA.

- 19- Rosenberg, S; Robbins, P; Restifo, N. Cancer Immunotherapy, en *Cancer; principles and practice of oncology*. Editor DeVita, V; Lawrence, T; Rosenberg, S. 9 ed, Lippincott Williams & Wilkins, 2011; Philadelphia, USA.
- 20- Yahalom, J; Portlock, C. Cardiac Toxicity, en *Cancer; principles and practice of oncology*. Editor DeVita, V; Lawrence, T; Rosenberg, S. 9 ed, Lippincott Williams & Wilkins, 2011; Philadelphia, USA.
- 21- Bristow, R; Hill, R. Hypoxia and metabolism: Hypoxia, DNA repair and genetic instability. *Nature Reviews Cancer* 8, 180-192, 2008.
- 22- Peters, K; Brown, J.M. Tirapazamine: A Hypoxia- activated Topoisomerase II poison. *Cancer Research* 62, 5248-5253, 2002.
- 23- Cerecetto, H; González, M; Lavaggi, M.L. Development of hypoxia selective cytotoxins for cancer treatment: an update. *Medicinal Chemistry*. 2, 315-327, 2006.
- 24- Martínez-Crespo, F. J.; Palop, J. A.; Sainz, Y.; Narro, S.; Senador, V.; González, M.; López de Ceráin, A.; Monge, A.; Hamilton, E.; Baker A. J. Hypoxia-selective agents derived from quinoxaline 1,4-di-N-oxides. *Journal of Medicinal Chemistry*. 38, 1786-1792, 1995.
- 25- Monge, A.; Martínez-Crespo, F. J.; López de Ceráin, A.; Palop, J. A.; Narro, S.; Senador, V.; Marín, A.; Sainz, Y.; González, M.; Hamilton, E.; Baker A. J. Hypoxia- selective agents derived from 2-quinoxalinecarbonitrile 1,4-di-N-oxides. 2. *Journal of Medicinal Chemistry*. 38, 4488-4494, 1995.
- 26- Urquiola, C.; Vieites, M.; Torre, M.; Cabrera, M.; Lavaggi, M.; Cerecetto, H.; González, M.; López de Ceráin, A.; Monge, A.; Smircich, P.; Garat, B.; Gambino, D. Cytotoxic palladium complexes of bioreductive quinoxaline N<sup>1</sup>,N<sup>4</sup>-dioxide prodrugs. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. 17, 1623-1629, 2009.
- 27- Chikamori, K; Grozav, A.G.; Kozuki, T; Grabowski, D; Ganapathi, R; Ganapathim, M.K. DNA Topoisomerase II Enzymes as Molecular Targets. *Current Cancer Drug Targets*. 10, 758-771, 2010.
- 28- Rasheed, Z.A; Rubin, E.H.. Topoisomerase-interacting agents, *Cancer; principles and practice of oncology*. Editor DeVita, V; Lawrence, T; Rosenberg, S. 9 ed, Lippincott Williams & Wilkins, 2011; Philadelphia, USA.
- 29- Woski, S.A.; Schmidt, F.J. DNA y RNA: Composición y estructura, en *Bioquímica, libro de texto con aplicaciones clínicas*. Editor Devling, T.M.. 4 ed, editorial Reverté, S.A., 2004; Barcelona, España.
- 30- Champoux, J. DNA topoisomerases: structure, function and mechanism. *Annual Review in Biochemistry* 70, 369-413, 2001.
- 31- [fbio.uh.cu/](http://fbio.uh.cu/) acceso 06-09-2011

- 32- Berger, J.M. Structure of DNA topoisomerases. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1400, 3-18, 1998.
- 33- Yang, Z; Carey J.F.; Champoux, J.J. Mutational analysis of preferential binding of human topoisomerase I to supercoiled DNA. *The FEBS Journal*. 279 (20), 5906-5919, 2009.
- 34- <http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=1EJ9>
- 35- <http://www.rcsb.org/pdb/101/motm.do?momID=73>
- 36- Nelson, D; Cox, M. *Lehninger Principios de Bioquímica*. 5° ed, Ediciones Omega, 2009; Barcelona, España.
- 37- Berger, J. M; Gamblin S. J; Harrison, S. C; Wang, J. C. Structure and mechanism of DNA topoisomerase II. *Nature*. 379 (6562), 225-232, 1996.
- 38- Husain, I; Mohler, J. L.; Seigler, H. F.; Besterman, J. M. Elevation of topoisomerase I messenger RNA, protein, and catalytic activity in human tumors: demonstration of tumor-type specificity and implications for cancer chemotherapy. *Cancer Research*. 54, 539-546, 1994.
- 39- Pommier, Y; Pourquier, P; Fan, Y; Strumberg, D. Mechanism of action of eukaryotic DNA topoisomerase I and drugs targeted to the enzyme. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1400 (1-3), 83-106, 1998.
- 40- Pommier, Y. DNA topoisomerase I inhibitors: chemistry, biology and interfacial inhibition. *Chemical Review*. 109 (7), 2894-2902, 2009.
- 41- Mancini, G; D'Annessa, I; Coletta, A; Sanna, N; Chillemi, G; Desideri, A. Structural and dynamical effects induced by the anticancer drug topotecan on the human topoisomerase I- DNA complex. *Plos One*. 5 (6), 10934, 2010.
- 42- Sooryakumar, D; Dexheimer, T; Teicher, B; Pommier, Y. Molecular and cellular pharmacology of the novel noncamptothecin topoisomerase I inhibitor genz-644282. *Molecular Cancer Therapeutics*. 10 (8), 1490-1499, 2011.
- 43- Peterson, K; Cinelli, M; Morell, A; Mehta A; Dexheimer, T; Agama, K; Antony, S; Pommier, Y; Cushman, M. Alcohol-, diol-, and carbohydrate-substituted indenoisoquinolines as topoisomerase I inhibitors: investigating the relationship involving stereochemistry, hydrogen bonding, and biological activity. *Journal of Medicinal Chemistry*. 54 (14), 4937-4953, 2011.
- 44- Li, T; Houghton, P; Desai, S; Daroui, P; Liu, A, Hars, E; Ruchelman, A; LaVoie, E; Liu, L. Characterization of ARC-111 as novel topoisomerase I-targeting anticancer drug. *Cancer Research*. 63 (23), 8400-8407, 2003.

- 45- Wu, C; Li, T; Farh, L; Lin, L; Lin, T; Yu, Y; Yen, T; Chiang, C; Chan, N. Structural basis of type II topoisomerase inhibition by the anticancer drug etoposide. *Science*. 333 (6041), 459-462, 2011.
- 46- Nitiss, J. Targeting DNA topoisomerase II in cancer chemotherapy. *Nature Reviews Cancer*. 9 (5), 338-350, 2009.
- 47- Hawtin, R; Stockett, D; Byl, J; McDowell, R; Nguyen, T; Arkin, M; Conroy, A; Yang, W; Osheroff, N; Fox, J. Voreloxin is an anticancer quinolone derivate that intercalates DNA and poison topoisomerase II. *PloS One*. 5 (4): e10186, 2010.
- 48- Wilstermann, A; Bender, R; Godfrey, M; Choi, S; Anklin, C; Berkowitz, D; Osheroff, N; Graves, D. Topoisomerase II-drug interaction domains: identification of substituents on etoposide that interact with the enzyme. *Biochemistry*. 46 (28), 8217-8225, 2007.
- 49- Jacob, D; Mercer, S; Osheroff, N; Dewese, J. Etoposide quinone is a redox-dependent topoisomerase II poison. *Biochemistry*. 50 (25), 5660-5667, 2011.
- 50- Patterson, L. H. Bioreductively activated antitumor N-oxides: the case of AQ4N, a unique approach to hypoxia-activated cancer chemotherapy. *Drug Metabolism Review*. 34 (3), 581-592, 2002.
- 51- Spicer, J; Gamage, S; Atwell, G; Finlay, G; Baguley, B; Denny, W. Structure-activity relationships for acridine-substituted analogues of the mixed topoisomerase I/II inhibitor N-[2-(dimethylamino)ethyl]acridine-4-carboxamide. *Journal of Medicinal Chemistry*. 40 (12), 1919-1929, 1997.
- 52- Lewis, L; Mistry, P; Charlton, P; Thomas, H; Coley, H. Mode of action of the novel phenazine anticancer agents XR11576 and XR5944. *Anticancer Drugs*. 18 (2), 139-148, 2007.
- 53- Leontiou, C; Watters, G; Gilroy, K; Heslop, P; Cowell, I; Craig, K; Lightowlers, R; Lakey, J; Austin, C. Differential selection of acridine resistance mutations in human DNA topoisomerase II $\beta$  is dependent on the acridine structure. *Molecular Pharmacology*. 71 (4), 1006-1014, 2007.
- 54- Madigan, M; Martinko, J; Parker, J. Biología de la célula eucariota y microorganismos eucariotas, en *Brock Biología de los microorganismos*. 10<sup>o</sup> ed, Pearson educación, 2004; Madrid, España.
- 55- Madigan, M; Martinko, J; Parker, J. Nutrición, cultivo y metabolismo microbiano, en *Brock Biología de los microorganismos*. 10<sup>o</sup> ed, Pearson educación, 2004; Madrid, España.

- 56- Madigan, M; Martinko, J; Parker, J. Genómica microbiana, en *Brock Biología de los microorganismos*. 10<sup>o</sup> ed, Pearson educación, 2004; Madrid, España.
- 57- Spor, A; Nidelet, T; Simon, J; Bourgais, A; de Vienne, D; Sicard, D. Niche-driven evolution of metabolic and life-history strategies in natural and domesticated populations of *Saccharomyces cerevisiae*. *Bio Med Central Evolutionary Biology*. 9, 296, 2009.
- 58- Contopoulou, C; Cook, V; Mortimer, R. Analysis of DNA double strand breakage and repair using orthogonal field alternation gel electrophoresis. *Yeast*. 3 (2), 71-76, 1987.
- 59- Mortimer RK. Evolution and variation of the yeast (*Saccharomyces*) genome. *Genome Research*. 10 (4), 403-409, 2000.
- 60- Nitiss, J. Using yeast to study resistance to topoisomerase II- targeting drugs. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*. 34, S 6-S 13, 1994.
- 61- Nitiss, J; Liu, Y; Hsiung, Y. A temperature sensitive topoisomerase II allele confers temperature dependent drug resistance on amsacrine and etoposide: a genetic system for determining the targets of topoisomerase II inhibitors. *Cancer Research*. 53 (1), 89-93, 1993.

## ANTECEDENTES

### 2.1-Diseño racional de nuevos derivados de N,N'-dióxido de fenazina.

Como se explicó anteriormente los tumores sólidos presentan zonas hipóxicas que lo hacen resistente a terapias como quimioterapia y radioterapia. Por este motivo, surge la necesidad de desarrollar fármacos cuyo blanco sean las células hipóxicas, surgiendo entonces profármacos con agrupamientos bio-reducibles como quinonas, nitro derivados y N-óxidos. Estos agrupamientos son reducidos por enzimas óxido-reductasas presentes en las células vía un o dos electrones, generando radicales o especies citotóxicas, que provocan daño en el ADN<sup>1</sup>.

La bio-reducción de los N-óxido de aminas aromáticas vía un electrón genera el radical nitróxido, el cual tiene la capacidad de generar rupturas en el ADN. En presencia de oxígeno, el proceso redox compete con la reducción anterior. Paralelamente, la bio-reducción vía dos electrones da lugar a la correspondiente amina aromática (figura 2.1.1)<sup>2</sup>.

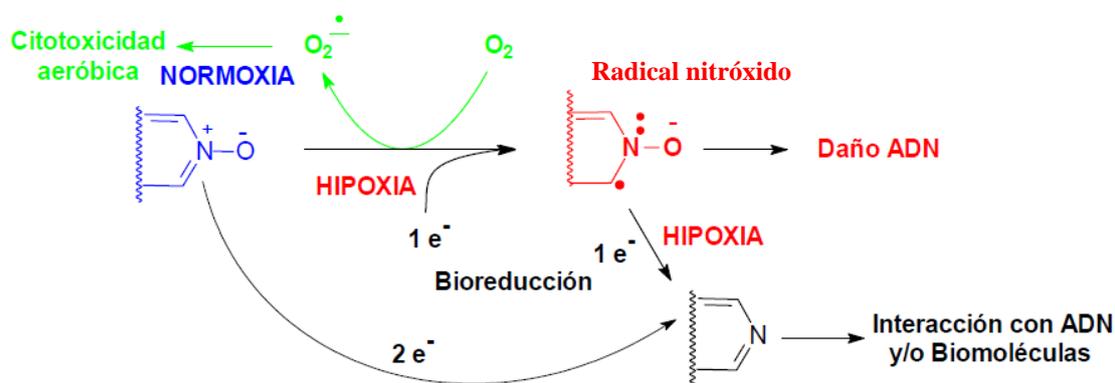


Figura 2.1.1 - Bio-reducción de derivados de N-óxido de aminas aromáticas.

La función N-óxido enmascara una carga positiva sobre aminas terciarias. Cuando los N-óxidos son metabolizados por reducción vía dos electrones dan lugar a las aminas correspondientes, las cuales suelen protonarse a pH fisiológico, y más considerando el pH levemente ácido de las células tumorales. De esta forma, la molécula adquiere una carga positiva que le permite interactuar con ADN y/o biomoléculas. Además baja su lipofilia, lo que no le permite atravesar la bicapa lipídica, quedando de esta manera confinada en el tejido enfermo, no dañando tejidos sanos<sup>2</sup>.

Desde el año 2003<sup>3</sup>, nuestro grupo de investigación ha desarrollado derivados de  $N^5,N^{10}$ -dióxido de fenazina, profármacos citotóxicos selectivos hacia células hipóxicas, que combinan dos agrupamientos químicos bioactivos. Esta familia de moléculas son “híbridos” que poseen un agrupamiento bio-reducible  $N$ -óxido, y por otro lado una estructura plana, el sistema fenazina, que puede interaccionar con el ADN.

El diseño racional se realiza a partir de dos fármacos antitumorales, tirapazamina y AQ4N, como se observa en la *figura 2.1.2*<sup>4-7</sup>. Tirapazamina es el primer fármaco que ha sido desarrollado para generar citotoxicidad selectiva en hipoxia. El mismo es un profármaco en donde la reducción de sus  $N$ -óxido de aminas aromáticas vía un electrón genera radicales  $OH^{\cdot}$  responsables de la citotoxicidad<sup>1</sup>. Además de ser citotóxico por la generación de radicales libres, es inhibidor de la topoisomerasa II, ya que estabiliza el complejo de corte ADN-topoisomerasa II<sup>8</sup>. Por otro lado, AQ4N<sup>1</sup> es un profármaco, la reducción vía dos electrones de sus  $N$ -óxidos generan radicales libres citotóxicos. Una vez que se metabolizan los  $N$ -óxidos, la molécula adquiere la propiedad de ser intercalante de ADN y veneno de la topoisomerasa II<sup>1</sup>.

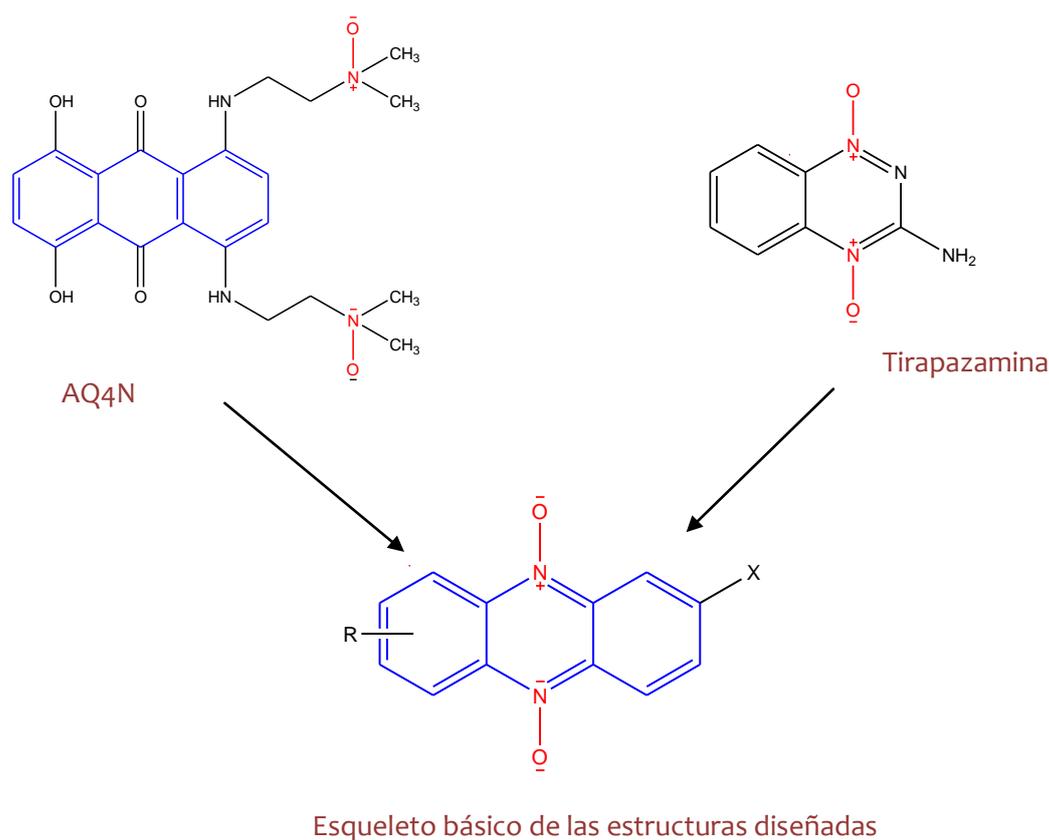
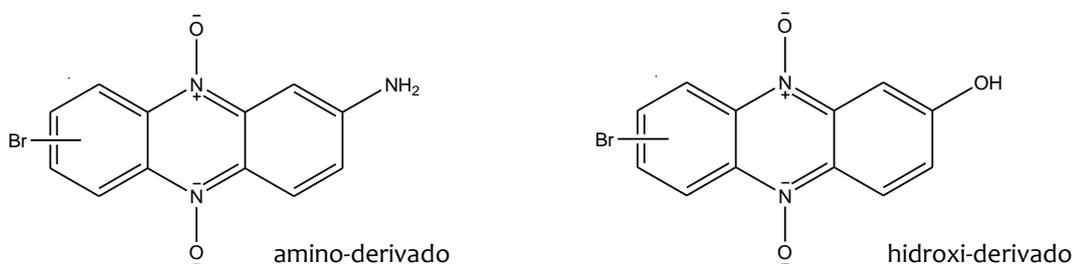


Figura 2.1.2- Diseño básico de profármacos de  $N,N'$ -dióxido de fenazinas.

En la *figura 2.1.3* se muestran dos derivados de  $N^5,N^{10}$ -dióxido de fenazina candidatos a fármacos. Los mismos presentan excelente perfil biológico en oxia/hipoxia *in vitro*<sup>4,7</sup>. Además fueron evaluados *in vivo* en un modelo de cáncer mamario inducido por N-metilnitrosourea. Ambos poseen baja toxicidad y un efecto antitumoral destacado en tumores sólidos de mama de ratas<sup>4,5,7</sup>.



*Figura 2.1.3- Derivados de  $N^5,N^{10}$ -dióxido de fenazina candidatos a fármacos.*

Los estudios realizados sobre el mecanismo de acción de estos compuestos sugieren que no son buenos agentes intercalantes, por lo que su citotoxicidad respondería a la generación del radical nitróxido<sup>6,9</sup>.

En el presente trabajo de final de carrera se pretende modificar estructuralmente a los derivados de  $N^5,N^{10}$ -dióxido de fenazina desarrollados por el grupo con buen perfil biológico, agregando cadenas laterales flexibles que podrían situarse en el surco menor del ADN. De esta manera, se pretende que el fármaco tenga una mayor interacción con el ADN y/o biomoléculas. Así surgen los derivados de  $N^5,N^{10}$ -dióxido de benciloxi, bencilamino y sulfonamida fenazina.

El diseño racional de los nuevos derivados se realiza a partir de los derivados de  $N^5,N^{10}$ -dióxido de fenazina que poseen buena actividad en oxia/hipoxia *in vivo* e *in vitro*<sup>4-7</sup> (*figura 2.1.3*), y del reconocido fármaco amsacrina<sup>10</sup>, el cual es intercalante del ADN e inhibidor de las enzimas topoisomerasas I y II (*figura 2.1.4*). De esta manera, los nuevos derivados tendrán un agrupamiento N-óxido que se bio-reduce selectivamente en hipoxia, dando lugar a un grupo aminofenazina, que quedará confinado en la célula tumoral ácida. La bio-reducción de los N-óxidos genera radicales libres citotóxicos, y da lugar a un sistema fenazina planar potencialmente intercalante del ADN. Además de la estructura plana correspondiente a la fenazina, los nuevos derivados poseen otra estructura plana correspondiente al grupo bencilo. Estas dos estructuras están dispuestas como para adquirir ortogonalidad, y de esta manera ser capaces de interactuar con el ADN y el sistema binario ADN-topoisomerasa, siendo posibles

inhibidores de las enzimas ADN topoisomerasas I y/o topoisomerasas II. Este mecanismo de acción es el que presenta el fármaco amsacrina, conteniendo un par de sistemas similares. Además este fármaco posee la funcionalidad sulfonamida que permite una interacción efectiva con ADN, esta funcionalidad la presentan el derivado sulfonamida de los  $N^5, N^{10}$ -dióxido de fenazina desarrollados anteriormente (figura 2.1.4).

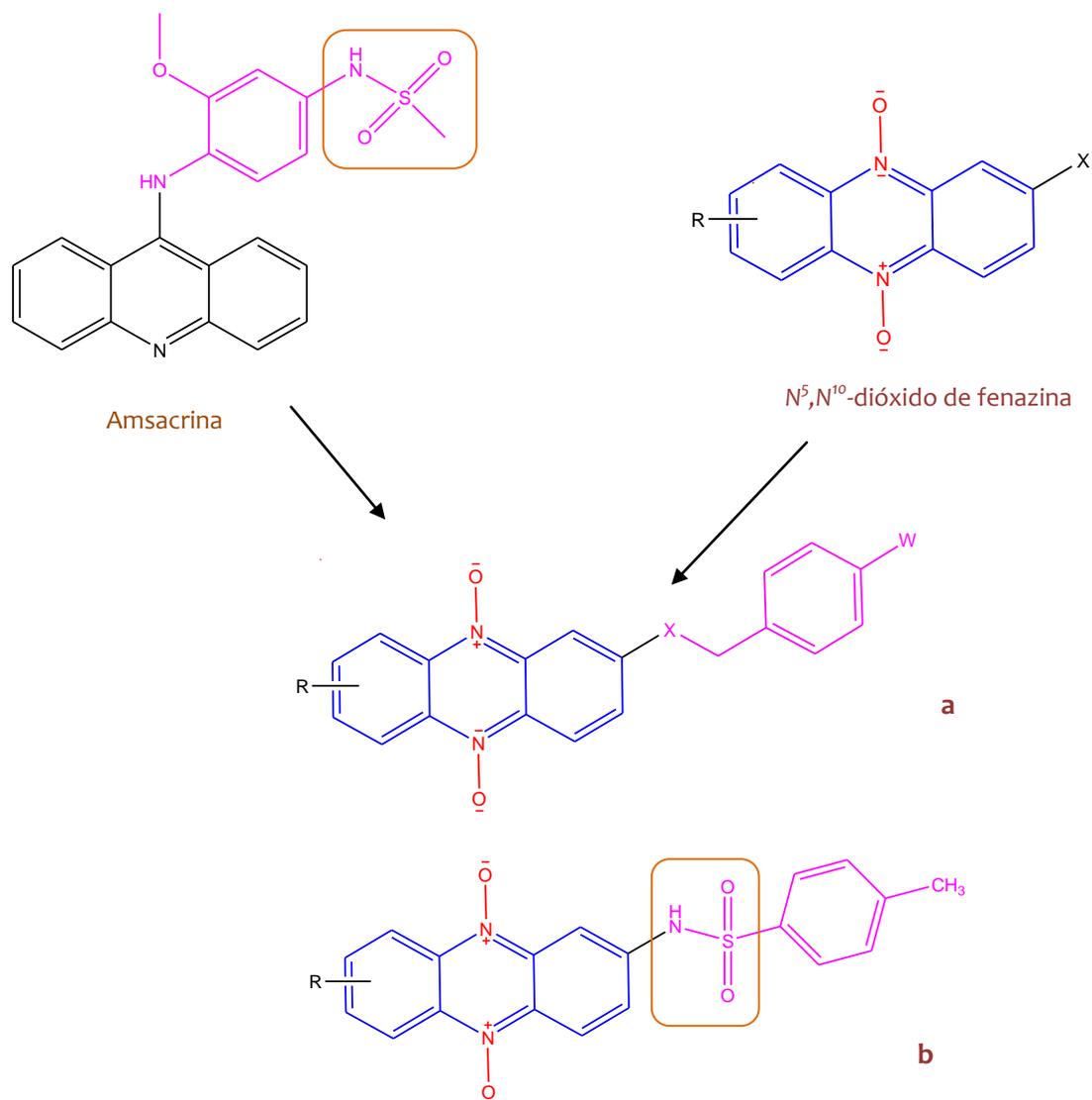
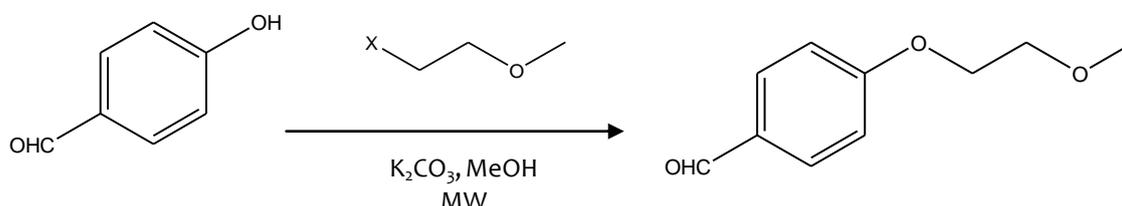


Figura 2.1.4- Estructuras químicas de amsacrina y  $N^5, N^{10}$ -dióxido de fenazina (arriba). Derivado de  $N^5, N^{10}$ -dióxido de benciloxi y bencilaminofenazina (a) y derivado de  $N^5, N^{10}$ -dióxido de sulfonamida fenazina diseñados (b). Se muestra como se combinan las estructuras de ambos farmacóforos en los derivados de  $N^5, N^{10}$ -dióxido de benciloxi, bencilamino y sulfonamida fenazina.

La síntesis de estos nuevos derivados se propone realizarla utilizando calentamiento por radiaciones de microondas. Esta propuesta surge como alternativa, ya que en nuestro trabajo previo, las sustituciones nucleofílicas sobre  $\text{NH}_2$  u  $\text{OH}$  de la posición 2(3) de  $\text{N}^5, \text{N}^{10}$ -dióxido de fenazina había sido deficiente o no posible en condiciones convencionales<sup>4</sup>. Está descrito que la síntesis utilizando calentamiento por radiaciones de microondas reduce el tiempo de reacción de horas a minutos, aumenta el rendimiento de las reacciones, y disminuye la generación de productos secundarios<sup>11,12</sup>.

Usualmente para la síntesis de éteres se utiliza la reacción de eterificación de Williamson<sup>13,14</sup>. Normalmente, este tipo de reacciones utilizando calentamiento por calor térmico, en presencia de  $\text{KOH}$ , pueden demorar hasta 12 horas para que se complete la misma<sup>13</sup>. Sin embargo, si el calentamiento es por radiaciones de microondas, los tiempos de reacción se reducen, por ejemplo la eterificación del *p*-cresol se completa en tres minutos<sup>13</sup>.

Por otra parte, la síntesis de feniléteres en presencia de una base más suave como  $\text{K}_2\text{CO}_3$ , está descrito que puede demorar hasta 72 horas de reacción<sup>14</sup>. Sin embargo, la síntesis asistida por microondas de estos compuestos en presencia de  $\text{K}_2\text{CO}_3$ , reduce los tiempos de reacción y los productos se obtienen con rendimientos de buenos a moderados<sup>14</sup> (figura 2.1.5).



-X	Temperatura (°C)	Tiempos de reacción (minutos)	Rendimiento (%)
-Br	100	15	45
-Cl	140	30	65

Figura 2.1.5- Ejemplos de síntesis asistida por microondas de feniléteres. Se muestran las condiciones de reacción, el tiempo de reacción y los rendimientos obtenidos<sup>14</sup>.

## **2.2-Estudio de inhibición de topoisomerasa II utilizando el modelo de levaduras *Saccharomyces cerevisiae*.**

Para llevar a cabo el estudio de inhibición de dicha enzima se han utilizado cuatro cepas de levaduras diferentes, SC7K(*lys2-3*), ts14-16, JN362a y JN362at2-1.

### SC7K(*lys2-3*)

La puesta a punto del ensayo de inhibición de la enzima topoisomerasa II se realiza en la cepa de levaduras Sc7K(*lys2-3*), la cual es salvaje para el gen de la topoisomerasa II. Esta cepa deriva de la cepa salvaje SC7K<sup>15</sup>, y presenta una mutación auxotrófica que afecta al codón de la lisina en el locus 2-3<sup>16</sup>. Esta mutación no es relevante para el presente estudio, ya que no afecta a la enzima en cuestión.

Sc7k(*lys2-3*) es utilizada en estudios de mutagenicidad<sup>17, 18</sup>. Se puede estudiar la mutagenicidad de compuestos químicos o rayos X por el crecimiento de colonias que al sufrir la mutación son capaces de revertir a la prototrofia, creciendo en un medio pobre en lisina. En el laboratorio donde se realizaron los ensayos de inhibición de la enzima topoisomerasa II (Departamento de Biofísica, Facultad de Medicina, UdelaR) se realizan trabajos de mutagenicidad con Sc7k(*lys2-3*)<sup>17, 18</sup>. Es entonces que se comenzaron a realizar los ensayos en esta cepa, ya que era la que se encontraba disponible y los investigadores tenían gran experiencia en su comportamiento.

### ts14-16

La cepa que se utilizó en primera instancia como mutante del gen de la enzima topoisomerasa II, es la cepa ts14-16<sup>19</sup>. Esta cepa de *Saccharomyces cerevisiae* es una cepa mutante del locus top2-1, la cual expresa una mutación temperatura dependiente. La mutación se expresa a 22°C. A esta temperatura la cepa presenta un crecimiento lento, ya que su temperatura óptima de crecimiento son 30°C. Esta cepa fue adquirida por el laboratorio donde se realizaron los ensayos de inhibición de la topoisomerasa II, para realizar estudios anteriores<sup>18</sup> al presente trabajo. ts14-16 fue creada por Mortimer, profesor del Departamento de Biología Molecular y Celular de la Universidad de California, Berkeley, y creador del Yeast genetic stock center. Mortimer y colaboradores han desarrollado varias cepas de levaduras con el fin de realizar diversas investigaciones<sup>19-22</sup>.

JN362a y JN362at2-1

Posteriormente, el laboratorio adquirió las cepas JN362a y JN362at2-1, creadas por Nitiss. El mencionado investigador y colaboradores han desarrollado modelos en levaduras *Saccharomyces cerevisiae* que permiten estudiar el mecanismo de acción de fármacos anti-topoisomerasa<sup>23</sup>. Ellos generan mutaciones en los genes de topoisomerasa de levaduras, que provocan un diferente nivel de expresión de dichas enzimas. Nitiss<sup>23-28</sup> ha trabajado con diversas mutaciones, generando así cepas que no expresan topoisomerasa I, cepas que sobreexpresan topoisomerasa II, cepas que expresan mínimamente topoisomerasa II, entre otros. También ha ensayado diversos fármacos como camptotecina, amsacrina, etopósido, en las diferentes cepas mutantes para concluir que dichos fármacos tienen como blanco a la topoisomerasa I y II respectivamente.

Las cepas más utilizadas en estos trabajos, son cepas de levaduras que contienen el alelo *top2-1* en vez de *TOP2*. El alelo *top2-1* expresa a una topoisomerasa II temperatura dependiente. A 25°C la expresión de la topoisomerasa II es igual a la expresión en las cepas salvajes para este gen, sin embargo a 30°C la expresión de esta enzima se reduce al mínimo suficiente para la viabilidad celular. No se han podido desarrollar mutantes que no expresen topoisomerasa II, porque esta enzima es esencial para la viabilidad celular<sup>24</sup>. Las cepas que contienen el alelo *top2-1* crecen óptimamente a 25°C (temperatura permisiva) y tienen una sensibilidad a los fármacos anti-topoisomerasa II similar a la cepa salvaje. A 30°C (temperatura semi-permisiva) también puede crecer pero de forma más lenta, a esta temperatura presentan una alta resistencia a fármacos anti-topoisomerasa II debido a la mínima expresión de la enzima<sup>23, 24</sup>.

En trabajos anteriores<sup>23,24</sup> se ha demostrado que las cepas que contienen el alelo *top2-1* muestran alta sensibilidad a amsacrina y etopósido a 25°C; sin embargo a 30°C muestran una alta resistencia a estos fármacos anti-topoisomerasa II. La sensibilidad de estas cepas también fue probada con camptotecina, concluyendo que a 30°C son hipersensibles a este fármaco anti-topoisomerasa I. Los resultados de las pruebas con estos tres fármacos demuestran que la resistencia observada a 30°C es específica para fármacos que interaccionan con la topoisomerasa II, y excluye la posibilidad de que la resistencia a los mismos sea por el crecimiento lento de estas cepas a la temperatura semi-permisiva (30°C)<sup>23</sup>.

En el presente trabajo se van a utilizar las cepas de Nitiss JN362a y JN362at2-1. Estas cepas son isogénicas, ambas contienen la mutación *ISE2* que se requiere para la permeabilidad de la

pared celular de la levadura a los fármacos. Las mismas se diferencian en que JN362a es salvaje para el gen de la topoisomerasa II, y JN362at2-1 contiene el alelo *top2-1*<sup>24</sup>.

### **Bibliografía**

- 1- Brown, J.M.; Wilson, W.R. Exploiting tumour hypoxia in cancer treatment. *Nature Reviews Cancer*. 4, 437-447, 2004.
- 2- Cerecetto, H; González, M; Lavaggi, M.L. Development of hypoxia selective cytotoxins for cancer treatment: an update. *Medicinal Chemistry*. 2 (3), 315-327, 2006.
- 3- Lavaggi, M.L. “Dióxidos de Fenazina como Agentes Citotóxicos selectivos en Hipoxia”. *Trabajo Especial II de Licenciatura en Bioquímica*. Facultad de Ciencias. Udelar. 2004.
- 4- Lavaggi, M.L. “Hipoxia como diana terapéutica para el tratamiento de tumores sólidos: desarrollo de profármacos selectivos de N,N’ dióxido de fenazina”. *Tesis de Doctorado en Química*. Facultad de Química. Udelar. 2009.
- 5- Cerecetto, H; González, M; Lavaggi, M.L; Azqueta, A; López de Cerain, A; Monge, A. Phenazine 5,10-Dioxide derivatives as hypoxic selective cytotoxins. *Journal of Medicinal Chemistry*. 48 (1), 21-23, 2005.
- 6- Lavaggi, M.L; Cabrera, M; González, M; Cerecetto, H. Differential enzymatic reductions governing the differential hypoxia-selective cytotoxicities of phenazine 5,10-dioxides. *Chemical Research in Toxicology*. 21 (9), 1900-1906, 2008.
- 7- Lavaggi, M.L; Cabrera, M; Pintos, C; Arredondo, C; Pachón, G; Rodríguez, J; Raymondo, S; Pacheco, J.P; Cascante, M; Olea-Azar, C; López de Cerain, A; Monge, A; Cerecetto, H; González, M. Novel phenazine 5,10-dioxides release OH in simulated hypoxia and induce reduction of tumor volume *in vivo*. *ISRN Pharmacology*. Article ID 314209, doi:10.5402/2011/314209, 2011.
- 8- Peters, K; Brown, J.M. Tirapazamine: A Hypoxia- activated Topoisomerase II poison. *Cancer Research* 62, 5248-5253, 2002.
- 9- Lavaggi, M.L; Cabrera, M; Aravena, M.A; Olea-Azar, C; López de Cerain, A; Monge, A; Pachón, G; Cascante, M; Bruno, A.M; Pietrasanta, L.I; González, M; Cerecetto, H. Study of benzo[a]phenazine 7,12-dioxide as selective hypoxic cytotoxin-scaffold.

- Identification of aerobic-antitumoral activity through DNA fragmentation. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 18 (12), 4433-4440, 2010.
- 10- Leontiou, C; Watters, G; Gilroy, K; Heslop, P; Cowell, I; Craig, K; Lightowers, R; Lakey, J; Austin, C. Differential selection of acridine resistance mutations in human DNA topoisomerase II $\beta$  is dependent on the acridine structure. *Molecular Pharmacology*. 71 (4), 1006-1014, 2007.
  - 11- Kappe, C. O. Controlled microwave heating in modern organic synthesis. *Angewandte Chemie International Edition*. 43 (46), 6250-6284, 2004.
  - 12- Perreux, L; Loupy, A. A tentative rationalization of microwave effects in organic synthesis according to the reaction medium, and mechanistic considerations. *Tetrahedron*. 57 (45), 9199-9223, 2001.
  - 13- Hayes, B.L. *Microwave synthesis: Chemistry at the speed of light*. CEM Publishing, 120-121, 2002; USA.
  - 14- Sarju, J; Danks, T; Wagner, G. Rapid microwave-assisted synthesis of phenyl ethers under mildly basic and nonaqueous conditions. *Tetrahedron Letters*. 45 (41), 7675-7677, 2004.
  - 15- Benathen, I; Beam, C. The genetic control of x-ray resistance in budding yeast cells. *Radiation Research*. 69 (1), 99-116, 1977
  - 16- Nunes, E; Brum, G; Candreva, E; Schenberg Frascino, A. Common repair pathways acting upon U.V.- and X-ray induced damage in diploid cells of *Saccharomyces cerevisiae*. *International Journal of Radiation Biology and Related Studies in Physics, Chemistry, and Medicine*. 45 (6), 593-606, 1984.
  - 17- Candreva, E. C; Keszenman, D.J, Barrios, E; Gelós, U; Nunes, E. Mutagenicity induced by hyperthermia, hot mate infusión, and hot caffeine in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cancer Research*. 53 (23), 5750-5753, 1993.
  - 18- Lillo, O; Bracesco, N; Nunes, E. Lethal and mutagenic interactions between c-rays, cisplatin and etoposide at the cellular and molecular levels. *International Journal of Radiation Biology*. 87 (2), 222-230, 2011.
  - 19- Contopoulou, C; Cook, V; Mortimer, R. Analysis of DNA double strand breakage and repair using orthogonal field alternation gel electrophoresis. *Yeast*. 3 (2), 71-76, 1987.

- 20- Johnston, J.R; Baccari, C; Mortimer, R.K. Genotypic characterization of strains of commercial wine yeasts by tetrad analysis. *Research Microbiology*. 151 (7), 583-590, 2000.
- 21- Mortimer RK. Evolution and variation of the yeast (*Saccharomyces*) genome. *Genome Research*. 10 (4), 403-409, 2000.
- 22- Cherry, J.M; Ball, C; Weng, S; Juvik, G; Schmidt, R; Adler, C; Dunn, B; Dwight, S; Riles, L; Mortimer, R.K; Botstein, D. Genetic and physical maps of *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature*. 387 (6632 Suppl), 67-73, 1997.
- 23- Nitiss, J. Targeting DNA topoisomerase II in cancer chemotherapy. *Nature Reviews Cancer*. 9 (5), 338-350, 2009.
- 24- Nitiss, J. Using yeast to study resistance to topoisomerase II- targeting drugs. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*. 34, S 6-S 13, 1994.
- 25- Nitiss, J; Liu, Y; Hsiung, Y. A temperature sensitive topoisomerase II allele confers temperature dependent drug resistance on amsacrine and etoposide: a genetic system for determining the targets of topoisomerase II inhibitors. *Cancer Research*. 53 (1), 89-93, 1993.
- 26- Nitiss, J. L; Liu Y. X; Harbury, P; Jannatipour, M; Wasserman, R; Wang, J.C. Amsacrine and etoposide hypersensitivity of yeast cells overexpressing DNA topoisomerase II. *Cancer Research*. 52 (16), 4467-4472, 1992.
- 27- Liu, Y. X; Hsiung, Y; Jannatipour, M; Yeh, Y; Nitiss, J. L. Yeast topoisomerase II mutants resistant to anti-topoisomerase agents: identification and characterization of new yeast topoisomerase II mutants selected for resistance to etoposide. *Cancer Research*. 54 (11), 2943-2951, 1994.
- 28- Ishida, R; Hamatake, M; Wasserman, R. A; Nitiss, J. L; Wang, J. C; Andoh, T. DNA topoisomerase II is the molecular target of bisdioxopiperazine derivatives ICRF-159 and ICRF-193 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cancer Research*. 55 (11), 2299-2303, 1995.

## OBJETIVOS

En base a los resultados preliminares detallados en la sección *Antecedentes* (capítulo 2), el diseño racional de nuevos derivados de  $N^5, N^{10}$ -dióxido de fenazina, y la utilización de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* como modelo de estudio de inhibición de la enzima topoisomerasa II, se proponen en el presente trabajo los siguientes objetivos generales y objetivos específicos.

### **3.1-Objetivos generales**

- Síntesis y caracterización estructural de derivados de  $N^5, N^{10}$ -dióxido de bencilamino, benciloxi y sulfonamida fenazina, que incorporan una cadena lateral flexible, pretendiendo aumentar la afinidad de interacción con el ADN y/o biomoléculas.
- Evaluación de la actividad biológica de inhibición de la enzima topoisomerasa II, en el modelo de levadura *Saccharomyces cerevisiae* de los nuevos derivados sintetizados y de los compuestos padres.
- Estudios de mecanismo de acción de los derivados  $N^5, N^{10}$ -dióxido de 7(8)-bromo-2-[2-(4-nitrobencil-1-il)]oxifenazina (**7**),  $N^5, N^{10}$ -dióxido de 7(8)-bromo-2-[2-(4-clorobencil-1-il)]oxifenazina (**10**), y  $N^5, N^{10}$ -dióxido de 7(8)-bromo fenazina-2-(4-metilfenil) sulfonamida (**13**).

### **3.2-Objetivos específicos**

- Generar los derivados de  $N^5, N^{10}$ -dióxido de bencilamino, benciloxi y sulfonamida fenazina mediante síntesis asistida por microondas y por vía tradicional.
- Puesta a punto del ensayo de inhibición de la enzima topoisomerasa II, utilizando el modelo de levadura *Saccharomyces cerevisiae*, utilizando como modelo el compuesto líder  $N^5, N^{10}$ -dióxido de 7(8)-bromo-2-hidroxifenazina (**1**).
- Evaluación de la inhibición de la enzima topoisomerasa II por los compuestos sintetizados en el presente trabajo.

- Evaluación de la capacidad de interacción con ADN de los derivados  $N^5,N^{10}$ -dióxido de 7(8)-bromo-2-[2-(4-nitrobenzil-1-il)]oxifenazina (**7**),  $N^5,N^{10}$ -dióxido de 7(8)-bromo-2-[2-(4-clorobencil-1-il)]oxifenazina (**10**),  $N^5,N^{10}$ -dióxido de 7(8)-bromo fenazina-2-(4-metilfenil) sulfonamida (**13**).
- Estudio de la bio-reducción en condiciones de oxia/hipoxia del derivado  $N^5,N^{10}$ -dióxido de 7(8)-bromo fenazina-2-(4-metilfenil) sulfonamida (**13**).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN: SÍNTESIS QUÍMICA

### 4.1- Síntesis de derivados de $N^5, N^{10}$ -dióxido de fenazina.

En el presente trabajo se pretende comparar los derivados O ó N sustituidos de  $N^5, N^{10}$ -dióxido de fenazina, que se plantean como agentes anti-topoisomerasa con sus compuestos padres, por esta razón se sintetizan los derivados de  $N^5, N^{10}$ -dióxido de fenazina (1-5) (tabla 4.1.1). La síntesis de los mismos se muestra en la figura 4.1.1. Los derivados 1-5 han sido previamente preparados por nuestro grupo de investigación<sup>1,2</sup> a escala de 100 – 200mg. En este trabajo de tesina se realiza un escalado de la síntesis de los mismos para lograr una cantidad de 500 – 1000mg. Los rendimientos obtenidos en el escalado de la síntesis son similares a los obtenidos previamente trabajando a menor escala (tabla 4.1.1).

La metodología llevada a cabo consta de dos etapas principales de síntesis (figura 4.1.1). En el primer paso se obtiene el derivado benzo[1,2-c]-1,2,5-oxadiazol (benzofuroxano) correspondiente. En el segundo paso se realiza la expansión del benzofuroxano con diferentes derivados de fenol, *p*-aminofenol o *p*-hidroxiquinona, obteniendo así los correspondientes  $N^5, N^{10}$ -dióxido de 2-aminofenazinas o  $N^5, N^{10}$ -dióxido de 2-hidroxifenazinas<sup>1,2</sup> respectivamente (1-5). Los derivados de  $N^5, N^{10}$ -dióxido de fenazinas (1-5) se identifican por comparación con los patrones correspondientes por CCF (cromatografía de capa fina). Posteriormente se aíslan por precipitación, obteniendo rendimientos de buenos a moderados. Estos derivados se obtienen como mezcla de isómeros de posición no separables por ninguna técnica de aislamiento, y por tanto se utilizan en las reacciones siguientes como tales.

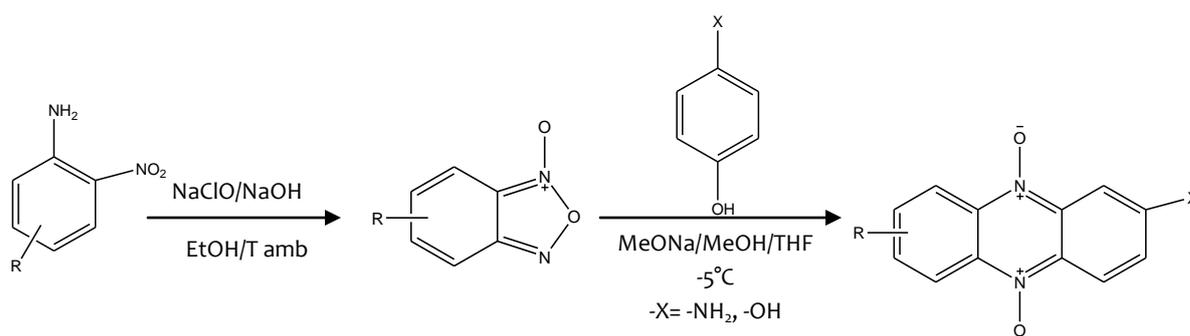
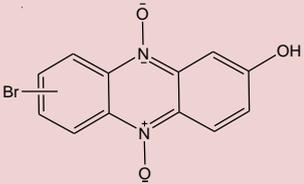
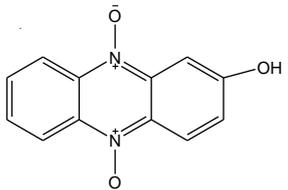
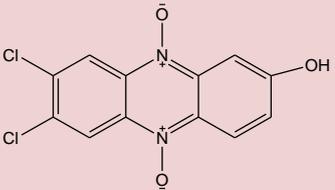
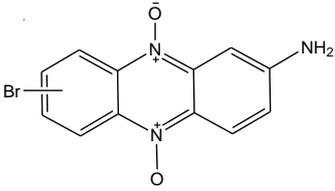
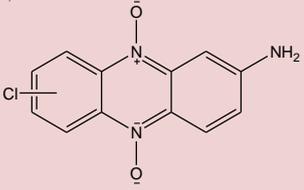


Figura 4.1.1- Esquema general de la síntesis de los derivados de  $N^5, N^{10}$ -dióxido de fenazina.

Tabla 4.1.1- Derivados de  $N^5,N^{10}$ -dióxido de fenazina previamente preparados por nuestro grupo de investigación. Se muestran los rendimientos trabajando a escala de 100-200mg y del escalado, obteniendo cantidades de producto de 500-1000mg.

	Derivados de $N^5,N^{10}$ -dióxido de fenazina	Rendimiento (100-200mg)	Rendimiento (500-1000mg)
1		50%	47%
2		47%	45%
3		48%	51%
4		45%	46%
5		48%	62%

Una vez sintetizados los derivados  $N^5,N^{10}$ -dióxido de 2-hidroxifenazinas (**1-3**) y  $N^5,N^{10}$ -dióxido de 2-aminofenazinas (**4-5**), se los hace reaccionar con diferentes haluros de bencilo o cloruro de fenilsulfonilo. De esta manera se preparan derivados de  $N^5,N^{10}$ -dióxido de fenazina

sustituídos en la posición 2, los cuales contienen una cadena lateral que podría incrementar la interacción de estos compuestos con ADN y/o biomoléculas.

La síntesis de estos derivados se propone realizarla utilizando calentamiento por radiaciones de microondas. Esta propuesta surge como alternativa, ya que en nuestro trabajo previo, las sustituciones nucleofílicas sobre  $\text{NH}_2$  u  $\text{OH}$  de la posición 2 de  $N^5, N^{10}$ -dióxido de fenazina había sido deficiente, o no posible en condiciones convencionales<sup>2</sup>. Como se mencionó en *antecedentes (capítulo 2)*, está descrito que la síntesis utilizando calentamiento por radiaciones de microondas reduce el tiempo de reacción de horas a minutos, aumenta el rendimiento de las reacciones, y disminuye la generación de productos secundarios<sup>3,4</sup>. En trabajos anteriores se han descrito síntesis asistidas por microondas de *O*-alquilaciones para la generación de feniléteres con tiempos de reacción de minutos, cuando la síntesis de los mismos por calentamiento térmico requiere horas<sup>5,6</sup>.

#### 4.2- Síntesis asistida por microondas de derivados de $N^5, N^{10}$ -dióxido de benciloxi y bencilaminofenazina.

En la *figura 4.2.1* se muestra el esquema general de síntesis de los derivados  $N^5, N^{10}$ -dióxido de benciloxi y bencilaminofenazina. Los mismos se preparan a partir de  $N^5, N^{10}$ -dióxido de fenazina (**1** y **5**) por reacción con haluros de bencilo, bajo diferentes condiciones.

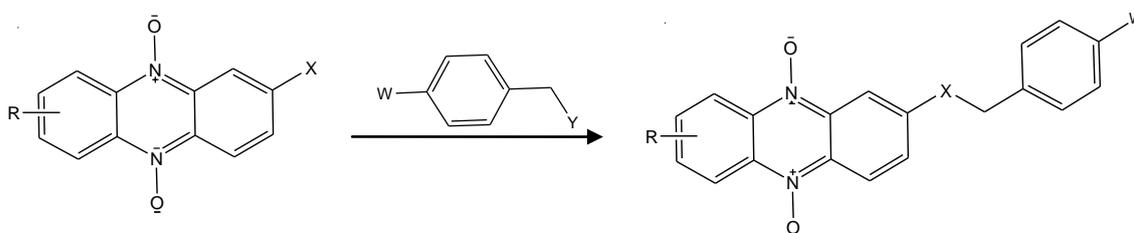
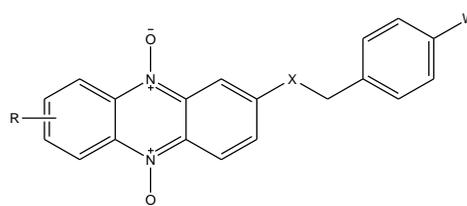


Figura 4.2.1- Esquema general de la reacción de sustitución nucleofílica. Los compuestos  $N^5, N^{10}$ -dióxido de fenazina en presencia de diferentes haluros de bencilo.  $R$  variable;  $X=N, O$ ;  $W$  variable,  $Y=Cl, Br$ .

La síntesis asistida por microondas de los derivados de  $N^5, N^{10}$ -dióxido de fenazinas **6-11** (tabla 4.2.1) se realiza mediante una reacción de sustitución nucleofílica tipo  $S_N2$ , en donde el átomo presente en la posición 2 de la fenazina ( $O, N$ ) ataca al carbono unido al halógeno presente en el haluro de bencilo, provocando la salida del halógeno. Como forma de evaluar la nucleofilia del sistema, se trabajaron con diferentes sustituciones a nivel de la posición 7(8) del heterociclo, incluyendo sustituyentes con diferentes propiedades esteroelectrónicas.

Para definir las condiciones óptimas para cada reacción de sustitución nucleofílica de los diferentes derivados,  $N^5, N^{10}$ -dióxido de 2-aminofenazinas y  $N^5, N^{10}$ -dióxido de 2-hidroxfenazina 7(8) sustituidos, se varían las condiciones de reacción. Por este motivo, se utilizan diferentes combinaciones de reactivos y catalizadores tales como,  $K_2CO_3$ , Éter corona (18-C-6), Ioduro de tetrabutilamonio (como catalizador de transferencia de fases) y  $CH_3CN$ . Las condiciones en las reacciones por radiación con microondas también fueron variables, fijando diferentes temperaturas, presión, tiempos y potencias, como se muestra en la *tabla 4.2.1*.

*Tabla 4.2.1- Condiciones de reacción utilizadas para los intentos de preparación de  $N^5, N^{10}$ -dióxido de 2-aminobencilfenazinas y  $N^5, N^{10}$ -dióxido de 2-hidroxbencilfenazinas-7(8)-sustituidos. A la derecha se muestra la estructura general de los compuestos sintetizados.*



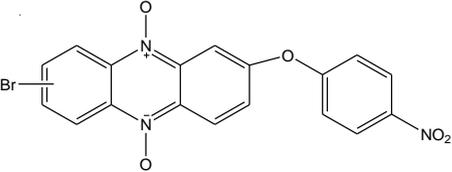
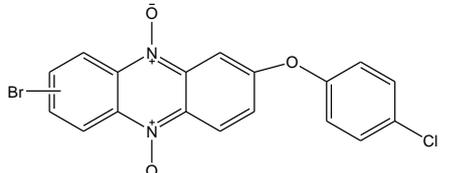
Compuestos	-R	-X	-W	Condiciones	Rendimiento. Producto aislado por CC. Observaciones
6	-CH <sub>3</sub>	-NH	-NO <sub>2</sub>	$K_2CO_3$ , $CH_3CN$ . 50°C, 200w, 5 atm, 1 h	No hay reacción
				$K_2CO_3$ , $CH_3CN$ , 18-C-6. 50°C, 200w, 5 atm, 15 min	Descomposición del reactivo, deoxigenación
				$K_2CO_3$ , $CH_3CN$ , Ioduro de tetrabutilamonio, 50°C, 200w, 5 atm, 15 min	Descomposición del reactivo, deoxigenación
				Ioduro de tetrabutilamonio. 120°C, 1 atm, 1000w, 25 min	Descomposición del reactivo, deoxigenación
7	-Br	-O	-NO <sub>2</sub>	50°C, 300w, 5 atm, 40 min	No hay reacción
				$CH_3CN$ , 120°C, 5 atm, 300w, 22 min	Trazas
				$K_2CO_3$ , $CH_3CN$ , 50°C, 300w, 5 atm, 30 min	Trazas
				<b><math>K_2CO_3</math>, <math>CH_3CN</math>, 120°C, 5 atm, 300w, 22 min</b>	<b>10%-Formación de productos secundarios</b>
8	-F	-NH	-NO <sub>2</sub>	$K_2CO_3$ , $CH_3CN$ , 18-C-6, Ioduro de tetrabutilamonio, 120°C, 5 atm, 700w, 30 min	No hay reacción

9	-OCH <sub>3</sub>	-O	-NO <sub>2</sub>	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> , 18-C-6, Ioduro de tetrabutilamonio, 120°C, 5 atm, 700w, 30 min	Formación de productos secundarios
10	-Br	-O	-Cl	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> , CH <sub>3</sub> CN, 50°C, 300w, 5 atm, 20 min	No hay reacción
				<b>K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, CH<sub>3</sub>CN, 18-C-6, Ioduro de tetrabutilamonio, 120°C, 8atm, 700w, 20 min</b>	<b>11%-Formación de productos secundarios</b>
11	-Cl	-NH	-Cl	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> , CH <sub>3</sub> CN, 50°C, 300w, 5 atm, 20 min	No hay reacción.
				<b>K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, CH<sub>3</sub>CN, 18-C-6, Ioduro de tetrabutilamonio, 120°C, 8atm, 700w, 20 min</b>	<b>7%-Formación de productos secundarios.</b>

Al finalizar la reacción, los productos son aislados, purificados por CC (cromatografía en columna) en sílica gel y caracterizados por espectroscopía de <sup>1</sup>H-RMN, <sup>13</sup>C-RMN, EM. Se obtienen al igual que los compuestos padres como mezclas de isómeros de posición los cuales no se pueden resolver en ninguna condición. Los productos secundarios no se caracterizaron.

De todos los intentos realizados sólo se pudieron obtener los derivados **7**, **10** y **11**. Esto demuestra la influencia de los sustituyentes en posición 7(8) en la reactividad de las fenazinas. Al comparar el método tradicional con el de calentamiento por radiaciones de microondas se observa que los productos **7** y **10** se generan en menores tiempos de reacción y con mayores rendimientos que por vía tradicional<sup>2</sup> (tabla 4.2.2), aunque también se generan productos secundarios.

Tabla 4.2.2- Se comparan los rendimientos y los tiempos de reacción de la síntesis vía tradicional y la síntesis asistida por microondas de los dos éteres obtenidos

Producto	Rendimiento (síntesis por vía tradicional) (%)	Tiempo de reacción (h)	Rendimiento (síntesis por microondas) (%)	Tiempo de reacción (min)
 <p style="text-align: center;"><b>7</b></p>	2	24	<b>10</b>	<b>22</b>
 <p style="text-align: center;"><b>10</b></p>	5	24	<b>11</b>	<b>20</b>

Para las reacciones en las que se utiliza como reactivos  $N^5, N^{10}$ -dióxido de 2-aminofenazinas sólo se pudo generar el producto **11**. En estas síntesis se utilizan  $K_2CO_3$  y 18-C-6, con el fin de aumentar la nucleofilia del nitrógeno, pero la misma no es la adecuada para obtener los productos deseados. En el caso del compuesto **6**, la fenazina se deoxigena antes de obtener el producto deseado, generando productos secundarios. En el caso del compuesto **8**, la reacción no se lleva a cabo.

Dada la diferencia de reactividad observada de los diferentes derivados de  $N^5, N^{10}$ -dióxido de fenazina, se propone estudiar teóricamente las propiedades esteroelectrónicas de los mismos. Se observan mapas de densidad electrónica mapeada sobre potencial electrostático (figura 4.2.2) y cargas Mulliken sobre los átomos nucleófilos (tabla 4.2.3)<sup>7</sup>.

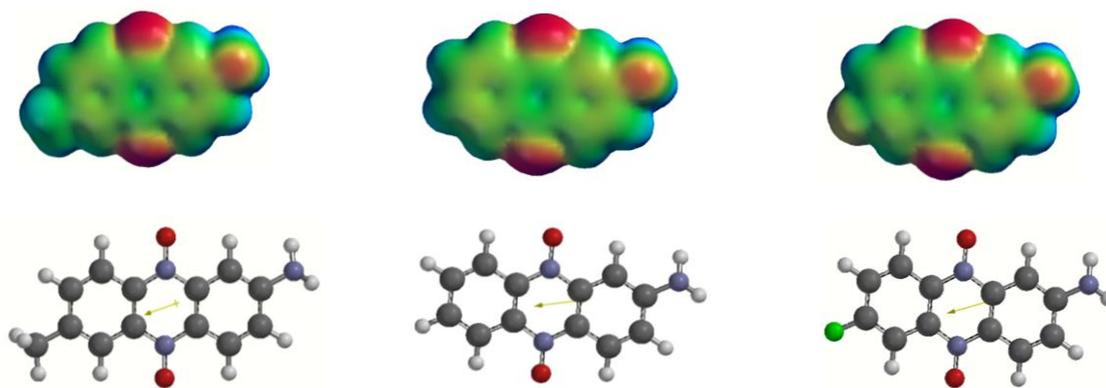
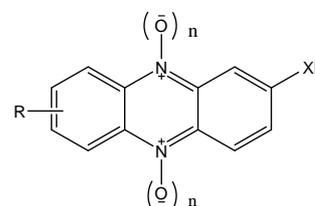


Figura 4.2.2- Distribución de la densidad electrónica mapeada sobre potencial electrostático de los compuestos 6\*, 12, 8\* y sus respectivas estructuras (tabla 4.2.3).

Tabla 4.2.3- Se muestra la carga Mulliken del átomo de nitrógeno y de oxígeno, sustituyentes en la posición 2(3), en presencia o en ausencia del oxígeno en la posición 5 y 10 del N<sup>5</sup>,N<sup>10</sup>-dióxido de fenazina



Referencia	-R	-X	n	Carga Mulliken N (X)	Carga Mulliken O (X)	Distancia O-H (Å)
1	-Br	-O	1		-0.629	0.950
9*	-CH <sub>3</sub> O	-O	1		-0.632	0.950
2	-H	-O	1		<b>-0.631</b>	0.950
2'	-H	-O	0		<b>-0.632</b>	0.950
6*	-CH <sub>3</sub>	-NH	1	-0.766		
12	-H	-NH	1	<b>-0.765</b>		
12'	-H	-NH	0	<b>-0.821</b>		
5	-Cl	-NH	1	-0.765		
8*	-F	-NH	1	<b>-0.765</b>		
8*'	-F	-NH	0	<b>-0.821</b>		

\*- Derivados de N<sup>5</sup>,N<sup>10</sup>- dióxido de fenazina que no fueron sintetizados en escalado, pero se utilizaron para el intento de generación de nuevos derivados.

‘- Derivados de fenazina, los mismos no contienen el agrupamiento N-óxido.

En los estudios teóricos no se observa ningún efecto relevante de los diferentes sustituyentes en la posición 7(8) sobre las propiedades estudiadas para los derivados de  $N^5, N^{10}$  dióxido de aminofenazina. En cambio, para estos derivados se observa el efecto electrón atrayente de los grupos  $N$ -óxido, que disminuyen la carga sobre el átomo de nitrógeno del grupo amino, lo que explica la baja reactividad de éste en estos compuestos, comparar derivados **12** y **12'**, **8\*** y **8\*' (tabla 4.2.3)**. En el caso de los derivados de  $N^5, N^{10}$ -dióxido de 2-hidroxifenazina, no se observa efecto de los sustituyentes ni del grupo  $N$ -óxido en la acidez del fenol (tabla 4.2.3).

Dada la baja nucleofilia del  $N$ , el único derivado de  $N^5, N^{10}$ -dióxido de bencilamino fenazina que se obtiene es el compuesto **11**. La reacción de sustitución nucleofílica tiene bajo rendimiento, 7%, pero es la primera vez que se obtiene un  $N$ -alquilderivado utilizando metodología asistida por microondas, que no se ha podido obtener por vía de síntesis tradicional<sup>2</sup>.

En resumen, las reacciones que se llevan a cabo exitosamente; productos **7**, **10** y **11**; todas son a altas temperaturas, aproximadamente 120°C, utilizando como disolvente  $CH_3CN$ . En el caso de los productos **10** y **11** se utiliza ioduro de tetrabutilamonio como catalizador de transferencia de fases, para lograr de esta manera una mejor solubilización de las fenazinas.

#### 4.3-Síntesis de derivado de $N^5, N^{10}$ -dióxido de 7(8) bromofenazina-2-(4-metilfenil) sulfonamida.

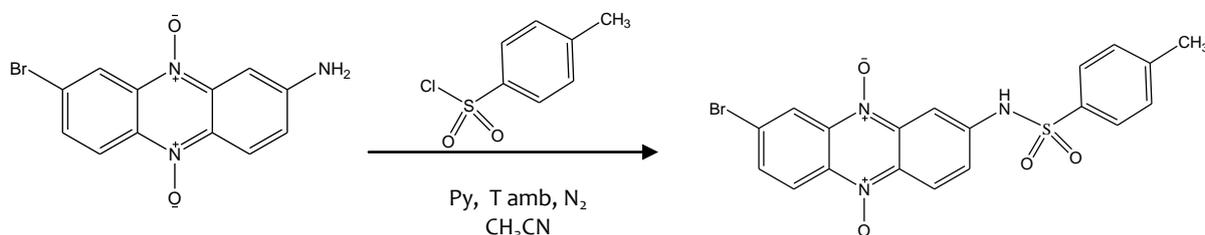


Figura 4.3.1- Esquema de síntesis del derivado de  $N^5, N^{10}$ - dióxido de 7(8) bromo fenazina-2-(4-metilfenil) sulfonamida.

La síntesis del derivado de  $N^5, N^{10}$ -dióxido de 7(8) bromo fenazina-2-(4-metilfenil) sulfonamida (**13**) se lleva a cabo mediante una reacción de sustitución nucleofílica, en donde el nitrógeno presente en la posición 2 de la fenazina ataca al azufre  $sp^2$  presente en el cloruro de  $p$ -toluensulfonilo, provocando la salida del cloruro (figura 4.3.1). Como forma de aumentar la nucleofilia del nitrógeno, se agrega la base piridina, para que desprotona al mismo. A su vez esta base favorece la reacción de sustitución, ya que desplaza el equilibrio neutralizando el HCl que se genera.

La reacción se lleva a cabo en 5,5 h, siendo el rendimiento de la misma de 5%. Por este motivo se busca otra forma de energía para llevar a cabo la reacción, utilizando entonces la síntesis por irradiación con microondas <sup>3,4</sup>.

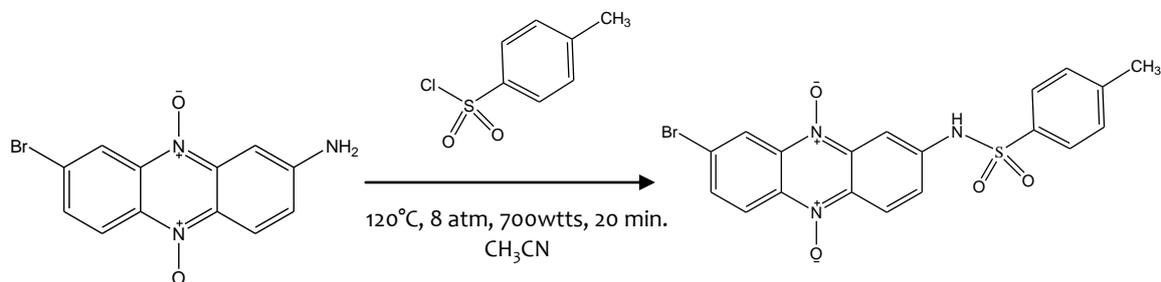


Figura 4.3.2- Esquema de síntesis asistida por microondas del derivado de  $N^5, N^{10}$ -dióxido de 7(8)-bromo fenazina-2-(4-metilfenil)sulfonamida.

La síntesis asistida por microondas utiliza los mismos reactivos que la síntesis por vía convencional, a excepción de la piridina (figura 4.3.2). Esta base no fue necesaria. La reacción en microondas transcurre en 20 min y tiene un rendimiento de 15%. Por lo tanto se concluye que la reacción ocurre en menores tiempos, aumentando el rendimiento <sup>2,3</sup>.

Luego de terminado el proceso de síntesis el producto es aislado, purificado por CC (cromatografía en columna) en sílica gel y caracterizado por espectroscopía de  $^1\text{H}$ -RMN,  $^{13}\text{C}$ -RMN, EM. Se obtienen al igual que los compuestos padres como mezclas de isómeros de posición los cuales no se pueden resolver en ninguna condición. Los productos secundarios no se caracterizaron. Como forma de ejemplificar la caracterización espectroscópica de la fenazina **13**, se muestran diferentes zonas del espectro de  $^1\text{H}$ -RMN en las figuras 4.3.3 y 4.3.4.

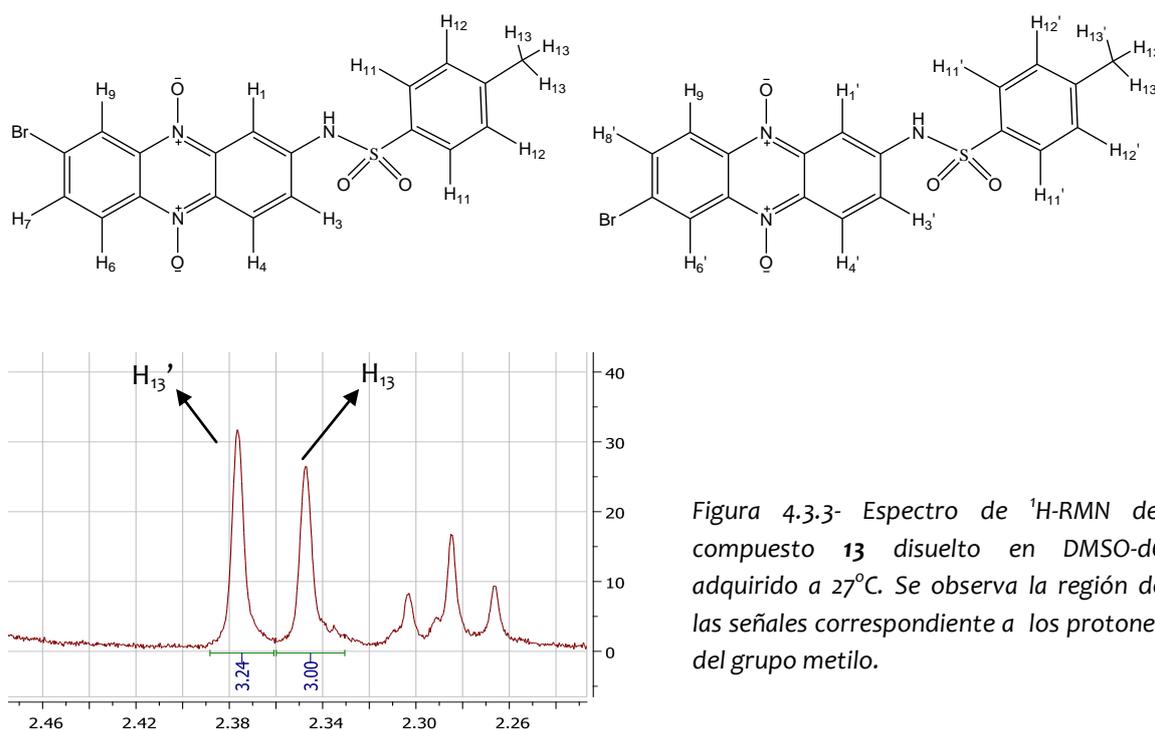
Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN del producto **13**

Figura 4.3.3- Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN del compuesto **13** disuelto en  $\text{DMSO-d}_6$  adquirido a  $27^\circ\text{C}$ . Se observa la región de las señales correspondiente a los protones del grupo metilo.

Las integraciones del espectro  $^1\text{H}$ -RMN del producto **13** se realizan tomando como referencia la integración de los protones del grupo metilo ( $\text{H}_{13}$ ) correspondiente al isómero de posición 7, estructura a la derecha de la figura 4.3.3. En el espectro se distinguen las señales de ambos isómeros de este grupo,  $\text{H}_{13}$  y  $\text{H}_{13}'$ . A partir de las integraciones de los grupos metilos de ambos isómeros se puede determinar la proporción de los mismos. La proporción es 7-isómero : 8 isómero (5.2 : 4.8), siendo el isómero en la posición 7 el mayoritario. Esta proporción es muy similar a la proporción de isómeros del derivado  $\text{N}^5, \text{N}^{10}$ -dióxido de 2-amino-7(8)-bromofenazina, que es el derivado fenazina que se utiliza como reactivo para la síntesis del derivado **13**, la cual es 7-isómero : 8 isómero (5.4 : 4.6).

A partir de las integraciones de los protones del grupo metilo, se determinan las integraciones de los protones aromáticos. A partir de las señales de estos protones ( $\text{H}_{13}$ ) se determinan las señales de los protones del grupo fenilo,  $\text{H}_{12}$  y  $\text{H}_{11}$ , mediante espectroscopía bidimensional HSQC y HMBC. Los protones del grupo metilo ( $\text{H}_{13}$ ) se correlacionan con el carbono al cual están unidos mediante espectroscopía HSQC. A su vez el carbono unido a  $\text{H}_{13}$  se correlaciona con  $\text{H}_{12}$  mediante espectroscopía HMBC. De esta manera se obtiene la señal de  $\text{H}_{12}$ . El mismo razonamiento se aplica para determinar la señal de  $\text{H}_{11}$  a partir de  $\text{H}_{12}$ .

Por otro lado los protones pertenecientes a la estructura fenazina son un poco más complejos de identificar, ya que las señales de los protones de ambos isómeros tienden a superponerse en la región correspondiente a los protones aromáticos. Para identificarlos se tiene como referencia los desplazamientos químicos ( $\delta$ ) del derivado  $N^5, N^{10}$ -dióxido de 2-amino-7(8)-bromofenazina, que como se mencionó es la estructura fenazina base del derivado **13**. Además se estudia la correlación entre los protones y sus carbonos mediante espectroscopía bidimensional HSQC y HMBC. De la estructura fenazina se puede deducir que los protones H<sub>4</sub>, H<sub>6</sub> y H<sub>9</sub>, que son los que se encuentran próximos al grupo N-óxido saldrán a  $\delta$  mayores a los demás protones, por el efecto de apantallamiento que genera este grupo sobre ellos. A su vez la señal correspondiente a H<sub>4</sub> puede salir a  $\delta$  mayores que la señal de H<sub>6</sub> y H<sub>9</sub>, ya que el átomo de bromo es un grupo electrón atrayente y disminuiría el efecto de apantallamiento generado por los N-óxidos en H<sub>6</sub> y H<sub>9</sub>. La región de las señales correspondientes a los protones aromáticos se muestra en la *figura 4.3.4*.

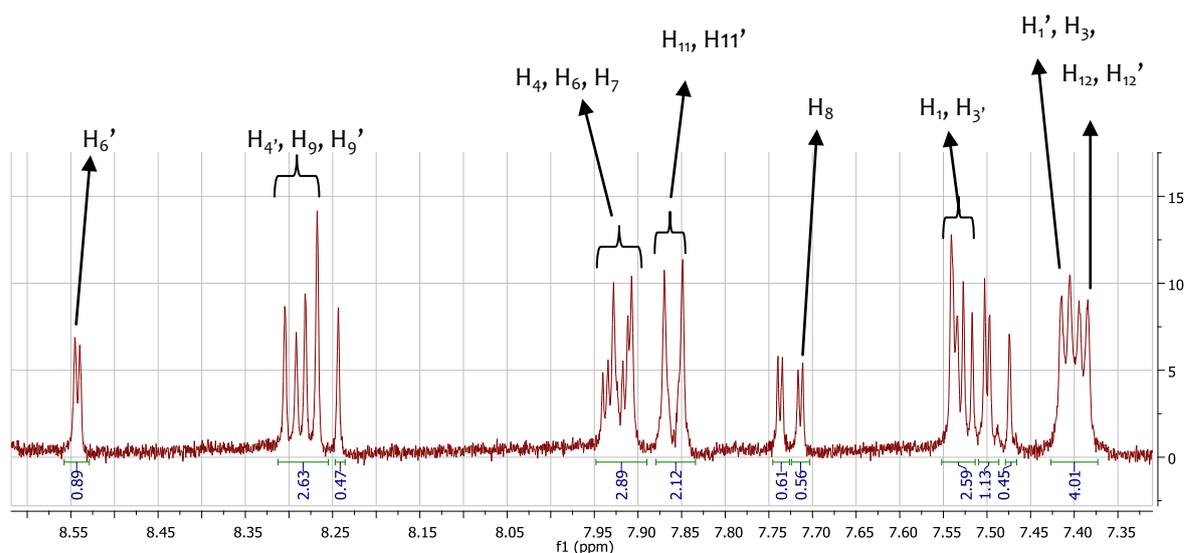


Figura 4.3.4- Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN del compuesto **13** disuelto en DMSO- $d_6$  adquirido a  $27^\circ\text{C}$ . Se observa la región de las señales correspondiente a protones aromáticos.

#### 4.4-Reducción del derivado $N^5, N^{10}$ -dióxido de 7(8) bromofenazina-2-(4-metilfenil) sulfonamida.

La reducción química del derivado  $N^5, N^{10}$ -dióxido de 7(8)-bromofenazina-2-(4-metilfenil) sulfonamida (**14**) se lleva a cabo por vía tradicional utilizando como reactivo ditionito de sodio, una sal inorgánica, que está descrita como reductora de N-óxidos heterocíclicos<sup>8</sup>. Además de los dos grupos N-óxido presentes en la molécula, la misma también posee un agrupamiento sulfonamida que podría ser reducido por ditionito de sodio, aunque no se han encontrado

antecedentes de agentes reductores de este agrupamiento. De esta manera la reacción de reducción puede generar varios productos posibles (figura 4.4.1).

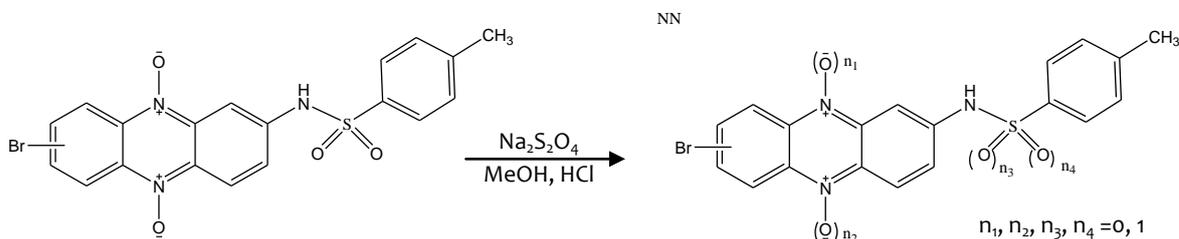


Figura 4.4.1- Esquema de la reacción de reducción del derivado  $N^5, N^{10}$ -dióxido de 7(8) bromofenazina-2-(4-metilfenil) sulfonamida.

La reacción transcurre en 3 h con un rendimiento de 45%. Por CCF se observa un sólo producto de reducción que tiene  $R_f$  similar a su compuesto padre (derivado **13**), pero un color diferente a la luz visible. Se piensa que el producto obtenido puede ser el derivado  $N^5$ -óxido de 7(8)-bromofenazina-2-(4-metilfenil)sulfonamida o el derivado  $N^{10}$ -óxido de 7(8) bromofenazina-2-(4-metilfenil)sulfonamida, ya que el ditionito de sodio está descrito como un agente reductor de  $N$ -óxidos heterocíclicos. Luego de la reducción, el producto es aislado, purificado por CC en sílica gel y caracterizado por espectroscopía de  $^1\text{H}$ -RMN,  $^{13}\text{C}$ -RMN, EM. Se obtienen al igual que los compuestos padres como mezclas de isómeros de posición los cuales no se pueden resolver en ninguna condición.

La espectrometría de masas revela que el derivado obtenido es el derivado mono-reducido, por lo tanto se esperaría que fuese el derivado  $N^5$ -óxido de 7(8)-bromofenazina-2-(4-metilfenil) sulfonamida o el derivado  $N^{10}$ -óxido de 7(8)-bromofenazina-2-(4-metilfenil)sulfonamida, como se comentó anteriormente. Se puede conocer cual de estos derivados es el producto obtenido mediante la elucidación de la espectroscopía.

El análisis espectroscópico se realiza análogamente a lo que se explicó para el derivado **13**. Se toma de referencia la integración de los protones del grupo metilo ( $H_{13}$ ), para integrar las señales de los protones aromáticos. En el espectro se distinguen las señales de ambos isómeros del grupo metilo,  $H_{13}$  y  $H_{13}'$ . A partir de las integraciones de ambos isómeros se puede determinar la proporción de los mismos. La proporción es 7-isómero : 8 isómero (5.6 : 4.4), siendo el isómero en la posición 7 el mayoritario. Esta proporción es muy similar a la proporción de isómeros del derivado **13**, la cual es 7-isómero : 8-isómero (5.2 : 4.8).

A partir de las señales de los protones H13 se determinan las señales de los protones del grupo fenilo, H12 y H11, mediante espectroscopía bidimensional HSQC y HMBC. En este espectro los protones que forman parte de la estructura de los grupos aromáticos también tienden a superponerse en la región correspondiente a los protones aromáticos. Para identificarlos se toman de referencia los  $\delta$  del derivado del derivado **13** y se estudia la correlación entre los protones y sus carbonos mediante espectroscopía bidimensional HSQC y HMBC.

Se identifica al derivado reducido por el decrecimiento en los  $\delta$  de los protones que se encuentran próximos a los grupos N-óxido. Por esta razón se comparan los  $\delta$  de las señales de H1, H4, H6, H9 y sus isómeros, entre los espectros del derivado **13** y el derivado **14**. En la figura 4.4.2 se muestra la estructura de los posibles productos obtenidos (a) y la zona de protones aromáticos del espectro <sup>1</sup>H-RMN del derivado **14** (b).

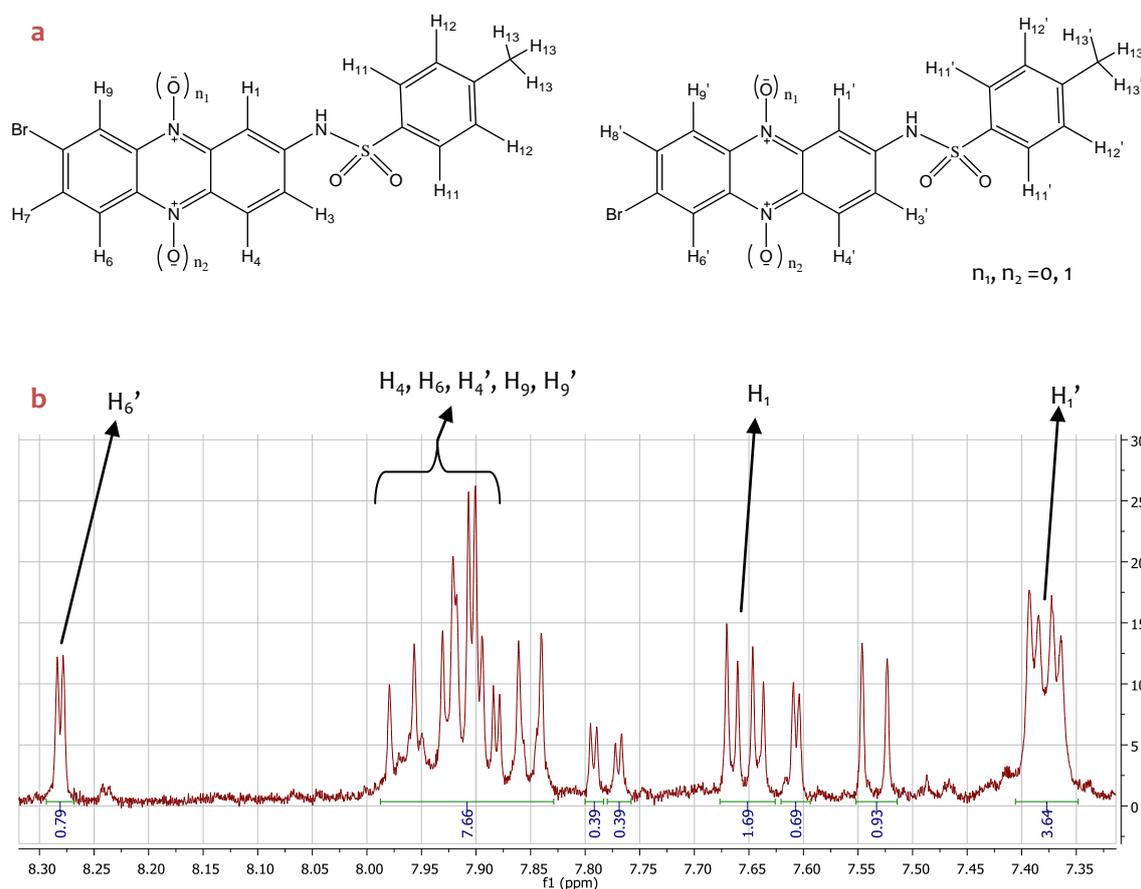


Figura 4.4.2- a- Estructura de los posibles productos obtenidos. b- Espectro de <sup>1</sup>H-RMN del compuesto **14** disuelto en DMSO-d<sub>6</sub> adquirido a 27°C. Se observa la región de las señales correspondiente a protones aromáticos. Se identifican los protones que varían su  $\delta$  dependiendo de la presencia del grupamiento N-óxido.

Al comparar las señales de los derivados **13** y **14**, se observa que las señales correspondientes a H1 y a H1' no disminuyen su  $\delta$ . Sin embargo si disminuye su  $\delta$  la señal correspondiente a H4', la misma tiene un  $\delta$  de 8.54ppm en el derivado **13** y disminuye a un  $\delta$  de 8.28ppm en el derivado **14**. Las señales correspondientes a H4, H4' H6, H9 y H9' no pueden compararse ya que las mismas se encuentran en el espectro del derivado **14** formando parte de un multiplete (7.89 – 7.98ppm) y no pueden elucidarse con claridad. Por lo tanto si se considera la disminución en el  $\delta$  que presenta la señal de H6' con respecto a las señales de H1 y H1', puede identificarse que el grupo N-óxido que se reduce es el que está próximo a H4 y a H6. Por lo tanto se identifica al producto de reducción como el derivado N<sup>5</sup>-óxido de 7(8) bromofenzina-2-(4-metilfenil) sulfonamida (**14**) (figura 4.4.3).

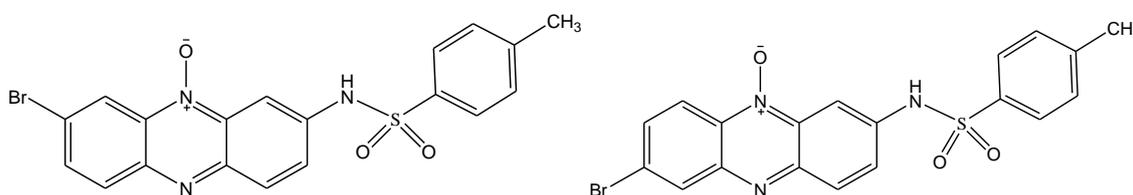


Figura 4.4.3- Estructura de los isómeros de posición derivados de N<sup>5</sup>-óxido de 7(8) bromofenzina-2-(4-metilfenil) sulfonamida obtenidos en la reacción de reducción.

### Bibliografía

- 1- Cerecetto, H; González, M; Lavaggi, M.L; Porcal, W. Preparation of phenazine N<sup>5</sup>,N<sup>10</sup>-dioxides. Effects of benzofuroxan substituents in the outcome of their expansion reaction with phenolates. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. 16 (6A), 1290-1296, 2005.
- 2- Lic. Lavaggi, M.L. “Hipoxia como diana terapéutica para el tratamiento de tumores sólidos: desarrollo de profármacos selectivos de N,N'-dióxido de fenazina”. *Trabajo de tesis de doctorado en química*. Facultad de Química. UdelaR. Páginas 30-45, 2009.
- 3- Kappe, C. O. Controlled microwave heating in modern organic synthesis. *Angewandte Chemie International Edition*. 43 (46), 6250-6284, 2004.
- 4- Perreux, L; Loupy, A. A tentative rationalization of microwave effects in organic synthesis according to the reaction medium, and mechanistic considerations. *Tetrahedron*. 57 (45), 9199-9223, 2001.

- 5- Hayes, B.L. *Microwave synthesis: Chemistry at the speed of light*. CEM Publishing, 2002; USA.
- 6- Sarju, J; Danks, T; Wagner, G. Rapid microwave-assisted synthesis of phenyl ethers under mildly basic and nonaqueous conditions. *Tetrahedron Letters*. 45 (41), 7675-7677, 2004.
- 7- Wavefunction. *Spartan 4.0 Tutorial and User's Guide Preliminary Edition*. Wavefunction, Inc, 2004; California, USA.
- 8- Albini, A; Pietra, S. *Heterocyclic N-oxides*. CRC Press, Inc. 1991; Boca Raton, Florida, USA.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN: BIOLOGÍA

### **5.1- Ensayo de inhibición de la enzima topoisomerasa II en levaduras *Saccharomyces cerevisiae*.**

En este ensayo se busca evaluar la inhibición de la enzima topoisomerasa II por parte de diferentes moléculas testeadas realizando la comparación de sobrevivencia de dos cepas de levaduras (sección 5.1.2). Una de las cepas utilizadas es salvaje del locus top2-1, por lo tanto la expresión de la enzima topoisomerasa II es normal. La otra cepa utilizada es mutante del locus top2-1, la misma expresa mínimamente a la enzima topoisomerasa II a una determinada temperatura. Las cepas salvajes son SC7K(Lys2-3) y JN362a, las cuales tienen una temperatura óptima de crecimiento a 30°C. Las cepas mutantes son ts14-16 y JN362at2-1, las mismas expresan su mutación a 22°C y 30°C respectivamente. La descripción de las diferentes cepas utilizadas se realiza en la sección 5.1.2. La determinación de la inhibición de la enzima se realiza comparando la sobrevivencia de la cepa salvaje con la mutante, SC7K(Lys2-3) y ts14-16, JN362a y JN362at2-1, siendo deseables valores de sobrevivencia menores a 10% para la cepa salvaje y 100% para la cepa mutante<sup>1</sup>.

#### **5.1.1- Puesta a punto del ensayo de inhibición de la enzima topoisomerasa II en levaduras**

En la puesta a punto de este ensayo, se buscan conocer las óptimas condiciones de incubación de las levaduras *Saccharomyces cerevisiae* con las diferentes moléculas de interés, para poder evaluar la inhibición de la enzima topoisomerasa II por parte de las mismas, presente en estas células. Para la puesta a punto se utiliza la cepa salvaje de levaduras *Saccharomyces cerevisiae* SC7K(lys2-3)<sup>2</sup>.

Para poder conocer las óptimas condiciones para la realización del ensayo se prueban diferentes condiciones. Se utilizan levaduras SC7K(lys2-3) en diferentes fases de crecimiento, fase exponencial y fase estacionaria, ya que ellas presentan diferentes metabolismos, reductivo y oxidativo respectivamente<sup>3,4</sup>. Se ensayan diferentes tiempos de incubación de las levaduras con los compuestos, para lograr una mejor penetración de los mismos en las células, que presentan además de membrana, pared celular. Se evalúan diferentes vehículos para mejorar la solubilidad de los productos a testear. Y por último, se evalúa si el ensayo puede llevarse a cabo en una atmósfera normóxica y/o hipóxica, para de esta forma simular el ambiente bio-reductor de una célula tumoral.

Para la puesta a punto del ensayo se utiliza el derivado N<sup>5</sup>,N<sup>10</sup>-dióxido de 7(8)-bromo-2-hidroxi-fenazina (**1**, tabla 4.1.1, página 53). En estudios previos de nuestro grupo, este

compuesto presentó una buena actividad biológica en ensayos de citotoxicidad en normoxia/hipoxia, en la línea celular V79, presentando citotoxicidad selectiva en hipoxia. A una concentración 20 $\mu$ M del compuesto, la fracción de supervivencia en normoxia de las células V79 fue de 80%, mientras que la fracción de supervivencia en hipoxia fue de 0%<sup>5,6</sup>.

En los ensayos biológicos el vehículo utilizado para el compuesto 1 es polietilenglicol (PEG 6000). Para confirmar que el PEG 6000 no es tóxico para las células se evalúa la sobrevivencia de las mismas en PEG 6000, con respecto a un control en agua destilada. El agua destilada es el medio en el cual se resuspenden las células al realizar lavados, y se las separa de su medio nutriente. La sobrevivencia celular en PEG 6000 es de 100%, por lo tanto el mismo no genera muerte celular.

En una primera instancia se busca conocer la sobrevivencia de las levaduras SC7K(*lys2-3*) en fase exponencial al tratarlas con el compuesto 1, a concentraciones de 0.1mM, 1mM y 5mM (figura 5.1.1.1). El compuesto se incubaba con las células por 40 min a 30°C.

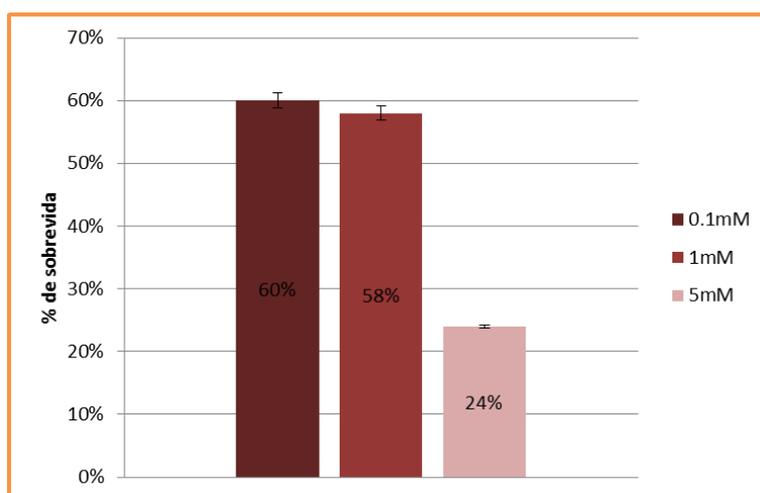


Figura 5.1.1.1- Porcentaje de sobrevivencia de las células SC7K(*lys2-3*) al tratarlas con diferentes concentraciones del compuesto 1 (0.1, 1 y 5mM).

Los resultados de este primer ensayo (figura 5.1.1.1) muestran una respuesta dosis efecto con respecto al compuesto 1. La sobrevivencia que se obtiene al tratar las células con una solución de concentración 5mM es de 24%. Como se busca obtener una sobrevivencia menor al 10%, se aumentan las concentraciones hasta 50mM. Además para observar el comportamiento de las levaduras en las diferentes fases de crecimiento, se utilizan levaduras en fase exponencial y en fase estacionaria.

### Fase exponencial – Fase estacionaria

Las levaduras presentan diferencias metabólicas en las diferentes fases de crecimiento. La fase exponencial, es una fase de fermentación en donde se genera un ambiente reductor, y la fase estacionaria es una fase de respiración, en donde se genera un ambiente oxidativo<sup>3,4</sup>.

En la fase exponencial las levaduras se dividen rápidamente, ya que están en su etapa óptima de crecimiento<sup>3</sup>; por lo que la enzima topoisomerasa II va a estar muy activa, participando en los procesos de división celular. Además en la fase exponencial las levaduras tienen un metabolismo reductor, que podría simular un ambiente celular reductor favorable, para evaluar si el mecanismo de acción del compuesto es por bio-reducción. En cambio, la fase estacionaria presenta un metabolismo oxidativo. En esta fase las células comienzan a dividirse lentamente hasta alcanzar su número máximo ( $N_{máx}$ )<sup>7</sup>. Como la división celular se enlentece, se piensa que la enzima no estaría tan activa como en la fase exponencial.

Entonces se evalúa el compuesto **1** en la cepa SC7K(*lys2-3*), en las diferentes fases de crecimiento a concentraciones de 5mM y 50mM. El mismo se incubó con las células 40 min a 30°C.

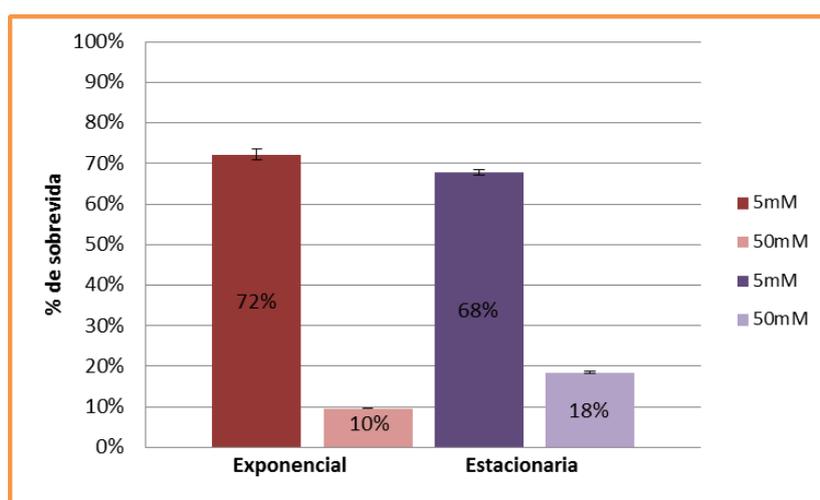


Figura 5.1.1.2- Porcentaje de supervivencia de las células SC7K(*lys2-3*) al tratarlas con diferentes concentraciones del compuesto **1** (5 y 50mM). Los resultados de supervivencia de las células en fase exponencial se expresan en barras rosa, mientras que los resultados de supervivencia de la fase estacionaria se expresan en barras violetas.

Los resultados que se observan en la figura 5.1.1.2 muestran una respuesta dosis efecto del compuesto **1** en ambas fases de crecimiento. Los porcentajes de supervivencia en las diferentes fases de crecimiento no presentaron diferencias significativas. Si bien se obtiene un porcentaje de supervivencia de 10% a una concentración 50mM del compuesto **1** para las levaduras en fase exponencial, el compuesto presenta baja solubilidad a esta concentración. Se decide entonces, continuar trabajando con las levaduras en fase exponencial y ensayar

concentraciones menores aumentando el tiempo de incubación, para lograr una mayor interacción entre el compuesto y la célula, con el fin de obtener los porcentajes de sobrevivencia deseados.

#### Tiempos de incubación

En levaduras la baja sensibilidad que presentan a compuestos químicos se ha atribuido a la baja permeabilidad de la pared celular, como de la membrana celular<sup>8</sup>. Por esta razón, se ensayan diferentes tiempos de incubación con el compuesto 1, para determinar si se logra una mejor interacción y penetración del mismo en la célula. Los tiempos de incubación ensayados son 40 y 60 min. Se utilizan concentraciones del compuesto 1, 5 y 10mM. La temperatura de incubación en ambos casos es 30°C.

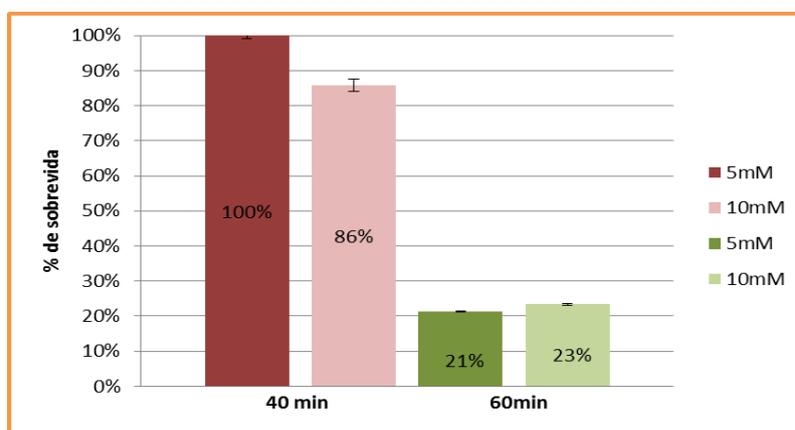


Figura 5.1.1.3- Porcentaje de sobrevivencia de las células SC7K(lys2-3) al tratarlas con diferentes concentraciones del compuesto 1 (5 y 10mM). Las barras en rosa muestran los resultados de la incubación con el compuesto por 40 min, y las barras en verde muestran los resultados de la incubación por 60 min.

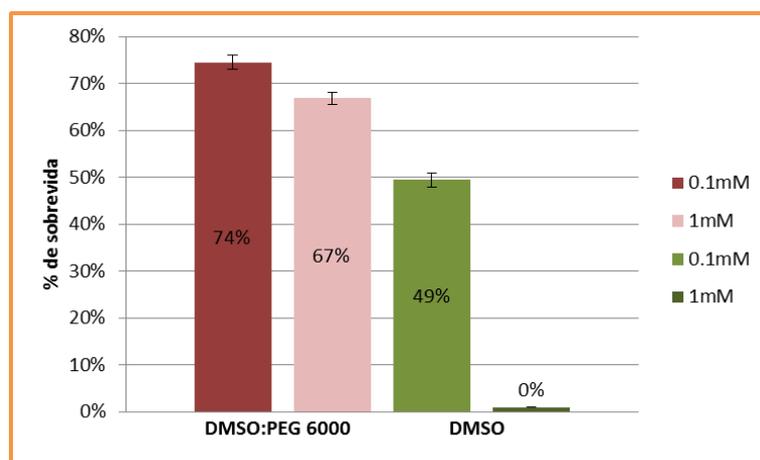
Los resultados muestran (figura 5.1.1.3) que al aumentar el tiempo de incubación a 60 min, hay una importante disminución del porcentaje de sobrevivencia con respecto a la incubación por 40 min. Por este motivo se decide utilizar 60 min como tiempo de incubación.

Es importante observar la diferencia de sobrevivencia que se obtiene a las concentraciones de 5mM y 10mM del compuesto, a los diferentes tiempos de incubación. Cuando la incubación es de 40 min, la sobrevivencia a las diferentes concentraciones (5 y 10mM) muestra una respuesta dosis efecto. Cuando la incubación es de 60 min las sobrevivencias no presentan diferencias y no se observa una respuesta dosis efecto. Este resultado puede deberse a que la internalización de los compuestos en la levadura alcance la concentración de saturación del mismo. En busca de una respuesta dosis efecto utilizando 60 min como tiempo de incubación se decide realizar el ensayo con el compuesto 1 a menores concentraciones.

### Vehículos

Como forma de evaluar el efecto del disolvente sobre la vehiculización de los compuestos se decide cambiar el que se utiliza, PEG 6000, por Dimetilsulfóxido (DMSO) a una concentración 5%. El DMSO no es genotóxico<sup>9</sup>. El mismo tiene capacidad de interactuar mediante enlaces de hidrógeno con ácidos nucleicos<sup>10</sup>. Esta asociación podría alterar el entorno del ADN, alterando de esta manera la interacción entre el fármaco, el ADN y la Topoisomerasa II. Por esta razón se utiliza a una baja concentración (5%). Además se ensaya como vehículo una mezcla de PEG 6000: DMSO, 1:1. En ambos casos se realizan controles con respecto al PEG 6000, para confirmar que los nuevos vehículos no presenten citotoxicidad. El porcentaje de sobrevivida que se obtiene utilizando los diferentes vehículos es de 100%. Esto indicaría que a la concentración de DMSO que se trabaja, él mismo no es citotóxico ni genotóxico para las levaduras.

Se realiza un ensayo utilizando diferentes vehículos, PEG 6000: DMSO, 1:1 y DMSO 5%. Las concentraciones utilizadas del compuesto 1 son 0.1 y 1mM. Se incubó 1 con las levaduras por 60 min a 30°C. Los resultados se muestran en la *figura 5.1.1.4*.



*Figura 5.1.1.4- Porcentaje de sobrevivida de las células SC7K(lys2-3) al tratarlas con diferentes concentraciones del compuesto 1 (0.1 y 1mM). Las barras en rosa muestran la sobrevivida celular al utilizar una mezcla DMSO:PEG6000 1:1 como vehículo del compuesto 1, y las barras en verde muestran la sobrevivida celular al utilizar como vehículo DMSO 5%.*

En el gráfico de la *figura 5.1.1.4* se observa que el porcentaje de supervivencia de las levaduras SC7K(lys2-3) disminuye notoriamente, cuando el vehículo utilizado para el compuesto 1 es DMSO. Además se observa una disminución de la sobrevivida a concentraciones del compuesto 1 menores que las anteriormente trabajadas. De esta forma se obtiene 0% de supervivencia para una concentración del compuesto 1 de 1mM.

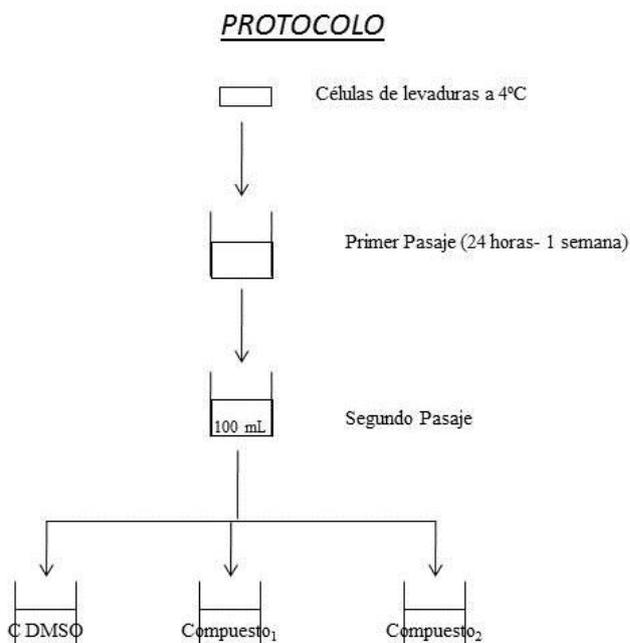
### Normoxia – Hipoxia

En el presente trabajo las condiciones de oxigenación que se utilizan son condiciones normóxicas. Como perspectiva para trabajos futuros, se evalúa la capacidad de realizar el ensayo bajo condiciones hipóxicas, para valorar la sobrevida de las células bajo las diferentes condiciones de oxigenación. La atmósfera hipóxica simula el ambiente bio-reductor de una célula tumoral.

Para evaluar la sobrevida de las células SC7K(*lys2-3*) en hipoxia, se incuban las mismas con su medio nutriente bajo atmósfera de nitrógeno a 30°C por 40 min. La sobrevida obtenida en condiciones de hipoxia se compara con la sobrevida de un control, el cual se realiza en una atmósfera normóxica, bajo las mismas condiciones de temperatura y tiempo de incubación. Los resultados muestran que el porcentaje de sobrevida en una atmósfera hipóxica es del 100%. Entonces se concluye que el ensayo puede llevarse a cabo bajo ambas condiciones de oxigenación.

### Ensayo de evaluación de inhibición de la enzima topoisomerasa II utilizando levaduras

De acuerdo a los resultados obtenidos utilizando el compuesto **1** como modelo se definieron las condiciones más adecuadas para el ensayo biológico de inhibición de la enzima topoisomera II. El mismo se va a llevar a cabo bajo una atmósfera normóxica, utilizando células de levaduras en fase exponencial, con un tiempo de incubación del compuesto de 60 min, y utilizando como vehículo DMSO 5%. El protocolo estandarizado del ensayo se muestra en la *figura 5.1.1.5*.



Se realiza un control en DMSO.

Siempre se utiliza como volumen final 2mL, la concentración de DMSO es de 5%.

Los productos se utilizan en concentraciones iguales o menores a 1mM, vehículo DMSO.

El ensayo se realiza en condiciones de fase exponencial en normoxia.

Se incuban las muestras por 60 minutos a la temperatura óptima de crecimiento las levaduras salvajes, y a la temperatura que expresan la mutación de la enzima las levaduras mutantes.

Luego se realizan 2 lavados descartando el sobrenadante y re suspendiendo el pellet en H<sub>2</sub>O destilada. En cada lavado se centrifuga a 5000 rpm por 4 minutos.

Finalmente se realizan diluciones 1/10000 para los controles y 1/1000 para las muestras tratadas.

Se siembran 200µL de cada dilución en placa de petri con YPDA por triplicado.

Figura 5.1.1.5- Diagrama del ensayo de inhibición de la enzima topoisomerasa II presente en levaduras

### 5.1.2- Cepas de levaduras

En los ensayos se utilizaron cuatro cepas de levaduras diferentes. En una primera instancia, se utilizan las cepas SC7K(*lys2-3*)<sup>2</sup> y ts14-16<sup>11</sup>. SC7K(*lys2-3*) es una cepa salvaje del locus top2-1, por lo tanto la expresión de la enzima topoisomerasa II es normal. ts14-16 es una cepa mutante del locus top2-1, la cual expresa su mutación a una determinada temperatura. La temperatura óptima de crecimiento de ambas cepas es 30°C, pero la cepa ts14-16 expresa la mutación a 22°C, es decir que a esta temperatura no presenta funcional a la enzima topoisomerasa II<sup>11</sup>.

Posteriormente, se trabaja con dos cepas isogénicas, JN362a y JN362at2-1<sup>1</sup>, cepa salvaje y mutante del locus top2-1 respectivamente. La ventaja que presentan estas cepas con respecto

a las primeras es que son isogénicas y están caracterizadas, permitiendo de esta manera un mejor estudio de la inhibición de la enzima topoisomerasa II.

JN362a y JN362at2-1 tienen una temperatura óptima de crecimiento a 30°C y a 25°C respectivamente. La cepa JN362at2-1 expresa la mutación en locus top2-1 a 30°C. A esta temperatura la expresión de la enzima es mínima, siendo suficiente para la viabilidad celular pero muy resistente a fármacos anti-topoisomerasa II<sup>1</sup>.

A las cuatro cepas se les realiza una curva de crecimiento a diferentes temperaturas. Realizando estas curvas se obtiene el número máximo de crecimiento celular (N<sub>máx</sub>), el tiempo de generación celular (TGC) y el comportamiento de las cuatro cepas a las diferentes temperaturas. A las cepas SC7K(lys2-3) y ts14-16 se las estudia a 22°C y 30°C (figuras 5.1.2.1 y 5.1.2.2; tablas 5.1.2.1 y 5.1.2.2). A las cepas JN362a y JN362at2-1 se las estudia a 25°C y a 30°C (figuras 5.1.2.3 y 5.1.2.4; tablas 5.1.2.3 y 5.1.2.4).

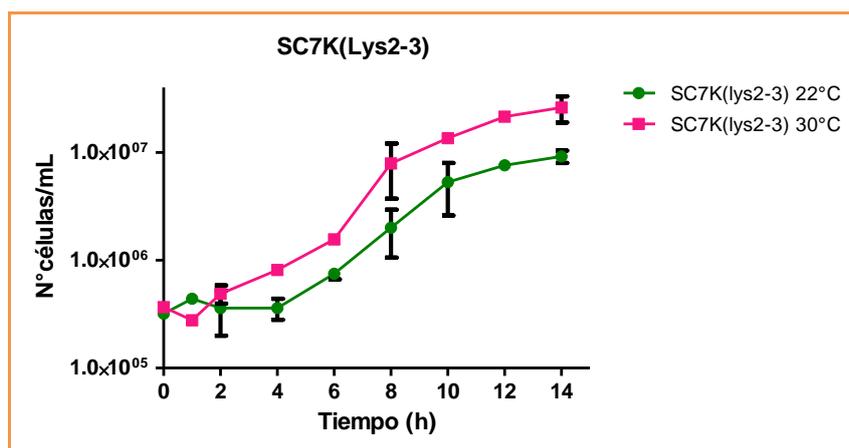


Figura 5.1.2.1- Curvas de crecimiento de la cepa de levadura SC7KLys a 22°C y a 30°C.

SC7K(lys2-3)		
	22°C	30°C
<b>N máx</b>	1.4 x 10 <sup>7</sup>	1.6 x 10 <sup>8</sup>
<b>TGC (h)</b>	2	1.5

Tabla 5.1.2.1- Número máximo de crecimiento celular (N máx) y tiempo de generación celular (TGC) a las temperaturas de trabajo de la cepa de levadura SC7KLys a 22°C y a 30°C, obtenidas a partir del gráfico de la Figura 5.2.1.

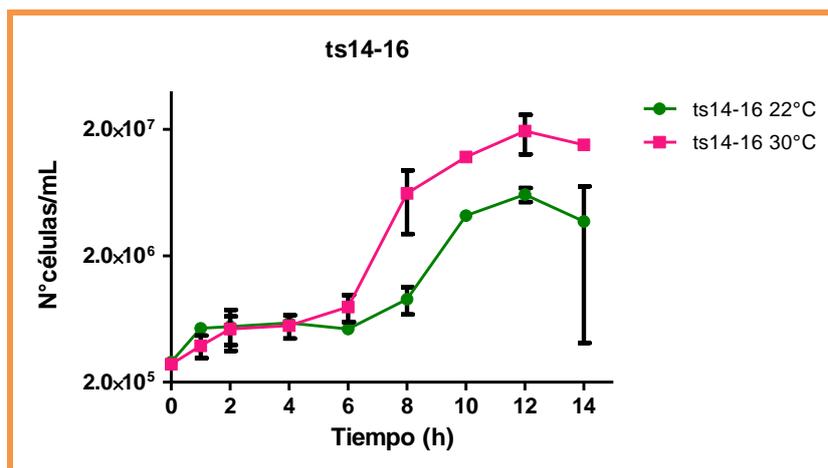


Figura 5.1.2.2- Curvas de crecimiento de la cepa de levadura ts14-16 a 22°C y a 30°C

ts14-16		
	22°C	30°C
N máx	$8.9 \times 10^7$	$3.4 \times 10^7$
TGC (h)	3	2

Tabla 5.1.2.2- Número máximo de crecimiento celular (N máx) y tiempo de generación celular (TGC) a las temperaturas de trabajo. Datos obtenidos a partir de las curvas de crecimiento de la cepa de levadura ts14-16 a 22°C y a 30° (figura 5.2.2.).

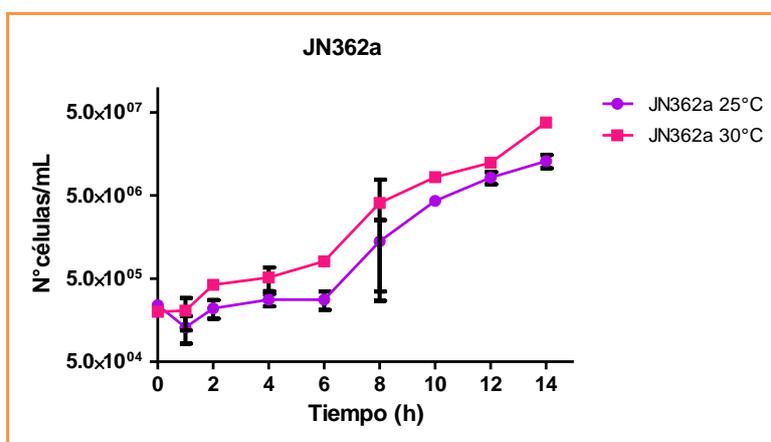


Figura 5.1.2.3- Curvas de crecimiento de la cepa de levadura JN362a a 25°C y a 30°C

JN362a		
	25°C	30°C
N máx	$1 \times 10^8$	$1 \times 10^8$
TGC (h)	2.5	2

Tabla 5.1.2.3- Número máximo de crecimiento celular (N máx) y tiempo de generación celular (TGC) a las temperaturas de trabajo. Datos obtenidos a partir de la curva de crecimiento de la cepa de levadura JN362a a 25°C y a 30°C (Fig. 5.2.3)

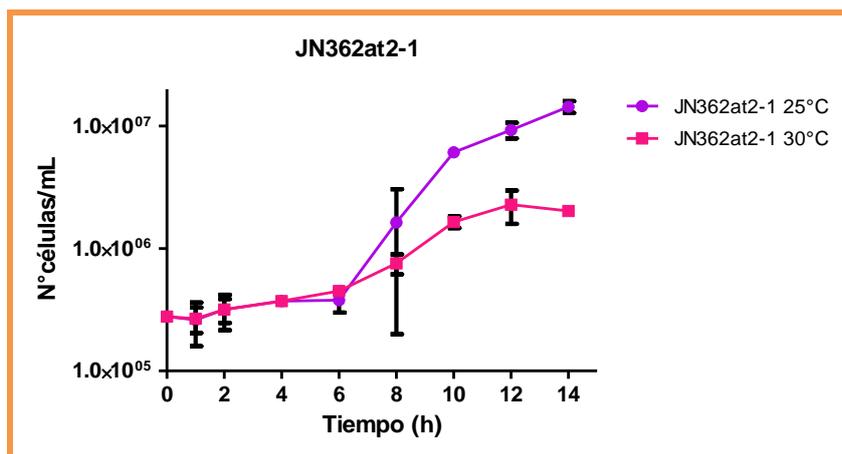


Figura 5.1.2.4- Curvas de crecimiento de la cepa de levadura JN362at2-1 a 25°C y a 30°C

JN362at2-1		
	25°C	30°C
<b>N máx</b>	7.5 x 10 <sup>7</sup>	6.2 x 10 <sup>7</sup>
<b>TGC (h)</b>	2.5	4

Tabla 5.1.2.4- Número máximo de crecimiento celular (N máx) y tiempo de generación celular (TGC) a las temperaturas de trabajo. Datos obtenidos a partir de la curva de crecimiento de la cepa de levadura JN362at2-1 a 25°C y a 30°C (fig. 5.2.4).

Las curvas de crecimiento permiten obtener para cada cepa de levaduras la temperatura óptima de crecimiento celular. Se comparan los gráficos a las diferentes temperaturas dentro de una misma cepa, y se observa para los diferentes tiempos a cual de las dos temperaturas hay mayor crecimiento celular, de esta forma se obtiene la temperatura de crecimiento óptimo. En la tabla 5.1.2.5 se observan las temperaturas óptimas de crecimiento para cada cepa de levaduras.

Tabla 5.1.2.5- Temperaturas óptimas de crecimiento celular para las diferentes cepas de levaduras.

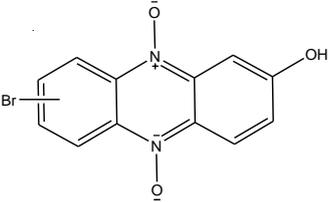
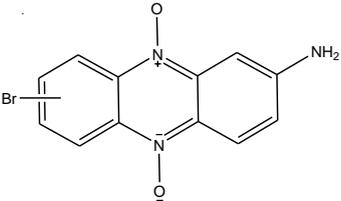
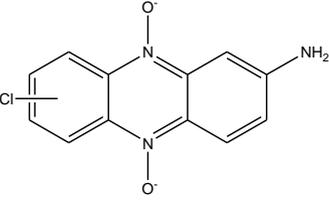
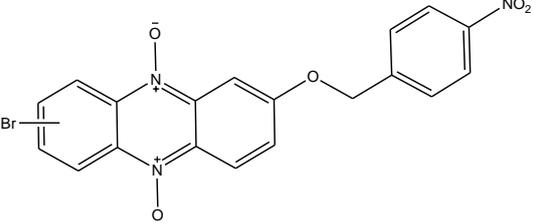
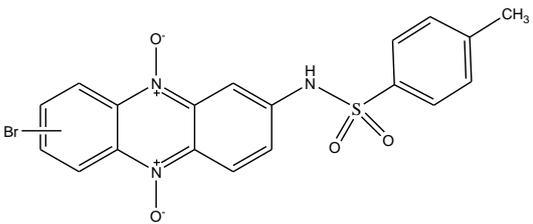
Cepa de levadura	Temperatura óptima de crecimiento (°C)
SC7K(lys2-3)	30
ts14-16	30
JN362a	30
JN362at2-1	25

### **5.1.3- Inhibición de la enzima topoisomerasa II en levaduras por fenazinas**

Los derivados de  $N^5,N^{10}$ -dióxido de 2(3)-aminofenazinas y  $N^5,N^{10}$ -dióxido de 2(3)-hidroxifenazina 7(8) sustituidos, se evalúan como potenciales inhibidores de la enzima topoisomerasa II presente en levaduras. Como se explicó anteriormente en antecedentes, estos compuestos están diseñados para presentar citotoxicidad por dos mecanismos, uno de ellos es por bio-reducción en hipoxia, y el otro por intercalación con el ADN o por inhibición de la topoisomerasa II. Se pretende evaluar si estos compuestos inhiben a la topoisomerasa II en condiciones de normoxia. La inhibición de la enzima topoisomerasa II en levaduras es letal, ya que las mismas son imprescindibles para la viabilidad celular<sup>1</sup>.

Se utilizaron en este trabajo derivados de  $N^5,N^{10}$ -dióxido de 2(3)-aminofenazinas y  $N^5,N^{10}$ -dióxido de 2(3)-hidroxifenazina 7(8) sustituidos, los mismos se muestran en la *tabla 5.1.3.1*.

Tabla 5.1.3.1- Estructura de los compuestos evaluados para conocer si generan citotoxicidad por interacción con la topoisomerasa II en levaduras.

Compuestos evaluados	
	<b>1</b>
	<b>4</b>
	<b>5</b>
	<b>7</b>
	<b>13</b>

En las cepas SC7K(*lys2-3*) y ts14-16, se ensayan los compuestos **1**, **4** y **7**, a una concentración 1mM. La incubación de los compuestos con las diferentes cepas se realiza a diferentes temperaturas, 30°C para la cepa salvaje y 22°C para la cepa mutante. A 22°C la cepa ts14-16 tiene una expresión mínima de la enzima topoisomerasa II.

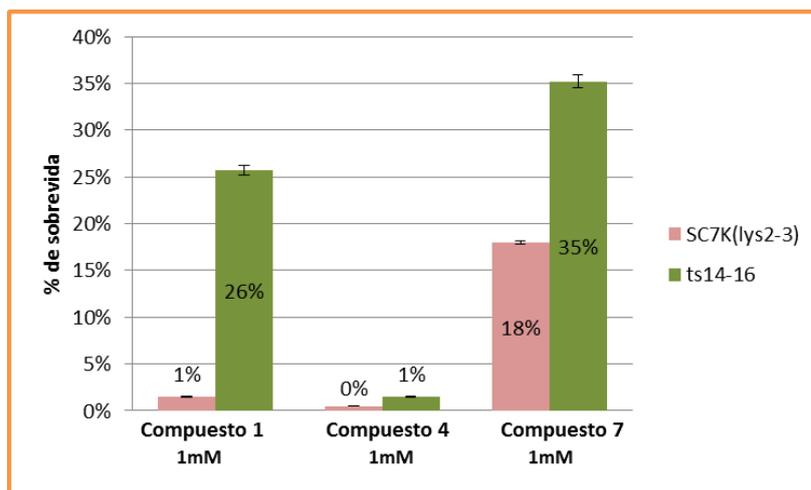


Figura 5.1.3.1- Porcentaje de sobrevivencia de las células SC7K(*lys2-3*) (barras color rosa) y ts14-16 (barras color verde) al tratarlas con los compuestos 1, 4 y 7, a una concentración 1mM.

Los resultados muestran que para el tratamiento con los compuestos 1 y 7, el porcentaje de sobrevivencia es mayor en la cepa ts14-16 que en la cepa SC7K(*lys2-3*) (figura 5.1.3.1). Lo que podría indicar que los compuestos 1 y 7 tienen un mecanismo de acción que involucra la inhibición de la enzima topoisomerasa II, ya que el porcentaje de sobrevivencia es mayor en la cepa mutante que en la cepa salvaje. Dado que los porcentajes de sobrevivencia son de 26 y 35 % respectivamente, para las células ts14-16, otro mecanismo que genere citotoxicidad debería estar involucrado.

El compuesto 4 genera una baja sobrevivencia en ambas cepas. Por lo tanto su mecanismo de acción, no estaría involucrado con la enzima topoisomerasa II. De todas formas el compuesto 4 debería ser testado a concentraciones menores que 1mM, para conocer si a dosis menores estos compuestos presentan inhibición de la enzima.

Posteriormente, se trabaja con las cepas de Nitiss JN362a y JN362at2-1. Como se comentó anteriormente, estas cepas son isogénicas, la primera es salvaje y la segunda lleva el alelo *atop2-1*. JN362at2-1 crece normalmente a 25°C (temperatura permisiva) y tiene aproximadamente una sensibilidad a los fármacos igual a la cepa salvaje. A 30°C (temperatura semipermisiva) la cepa puede crecer pero muy lentamente; a esta temperatura es altamente resistente a los fármacos anti-topoisomerasa II. Esto sucede porque a 30°C la expresión de la topoisomerasa II es muy baja, de todos modos la misma es suficiente para la viabilidad celular. Ambas cepas tienen la mutación *ISE2*, esta mutación se requiere para la permeabilidad al fármaco<sup>1</sup>.

En una primera instancia se realiza un ensayo utilizando el fármaco etopósido. El etopósido como se explica en la sección *Introducción* (capítulo 1, página 27), es uno de los agentes

quimioterápicos más utilizados en los diferentes tipos de cáncer humanos<sup>12</sup>. Este fármaco actúa como veneno de la enzima de la topoisomerasa II<sup>13</sup>, por lo tanto genera citotoxicidad cuando la enzima está presente. Se utiliza etopósido como control positivo. El tratamiento se realiza con concentraciones del fármaco 0.5mM y 1mM. La temperatura de incubación fue 30°C para ambas cepas.

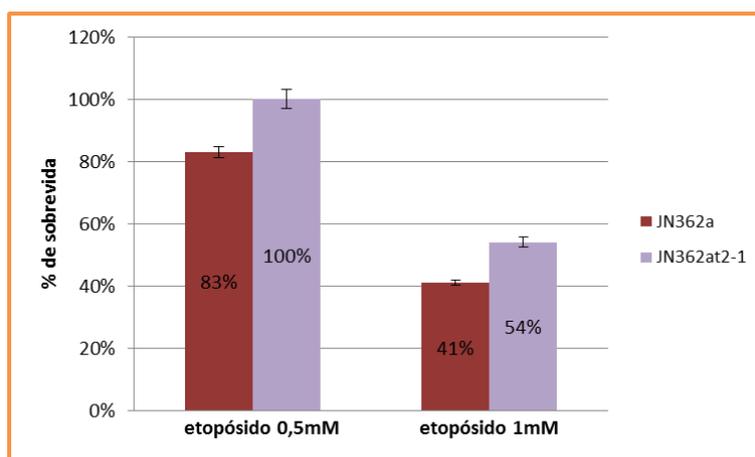


Figura 5.1.3.2- Porcentaje de sobrevivencia de las células JN362a (barras color rojo) y JN362at2-1 (barras color lila) al tratarlas con el fármaco etopósido, a una concentración de 0.5mM y 1mM.

Los resultados del ensayo muestran que el porcentaje de sobrevivencia es mayor en la cepa mutante que en la salvaje (figura 5.1.3.2). Estos resultados coinciden con lo esperado, ya que el etopósido debe ser citotóxico para las células que expresan a la topoisomerasa II salvaje.

Posteriormente se trata a las levaduras con los compuestos **1**, **4**, **5** y **13**. Los resultados se muestran en la figura 5.1.3.3.

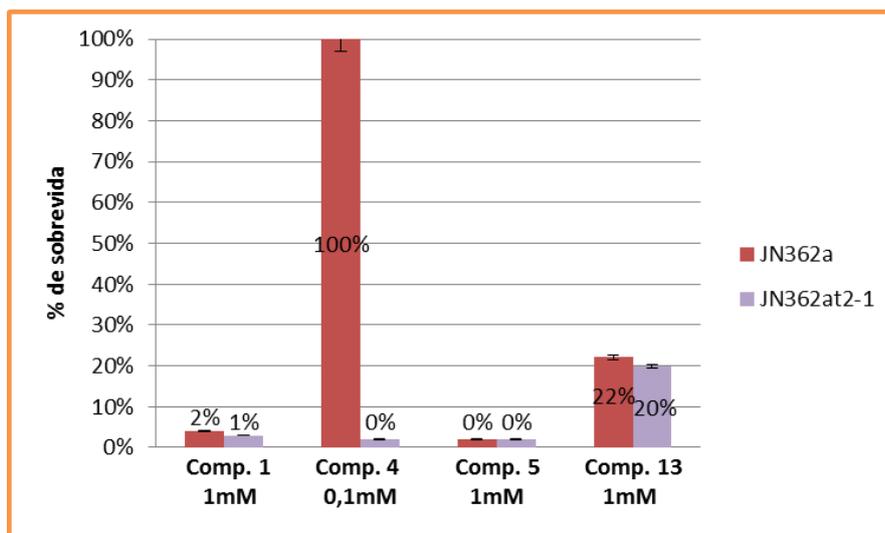


Figura 5.1.3.3- Porcentaje de sobrevida de las células JN362a (barras color rojo) y JN362at2-1 (barras color lila) al tratarlas con los compuestos 1,5 y 13 a una concentración 1mM; y con el compuesto 4 a una concentración 0.1mM.

Los resultados obtenidos del tratamiento con los compuestos 1, 5 y 13, no presentan diferencias significativas en el porcentaje de sobrevida de la cepa salvaje y la mutante. Estos resultados indicarían que los compuestos 1, 5 y 13 no son inhibidores de la enzima topoisomerasa II presente en levaduras. Los compuestos 1 y 5 presentan porcentajes de sobrevida muy bajos en ambos casos, entre 0% y 2%. Por lo tanto deberían ser testeados a concentraciones menores que 1mM, para conocer si a dosis menores estos compuestos presentan inhibición de la enzima.

El compuesto 4 tiene un comportamiento diferente al esperado, ya que genera una sobrevida del 0% en la cepa salvaje. Sin embargo genera una sobrevida del 100% en la cepa mutante.

Los compuestos 1, 4, 5 y 13 generan citotoxicidad en las levaduras lo que se visualiza por un porcentaje de supervivencia menor al 100%, esta disminución en el porcentaje de supervivencia no se genera por la inhibición de la enzima topoisomerasa II.

#### En resumen

El compuesto 1 muestra un perfil de inhibición de la enzima topoisomerasa II presente en la cepa de levaduras SC7K(*lys2-3*). Dado que la sobrevida de las células ts14-16 es de 26%, se cree que debería estar involucrado otro mecanismo que genere citotoxicidad, ya que si no se esperarían que la sobrevida de dichas células fuese próxima a 100%. El compuesto 1 no muestra ese perfil de inhibición de la enzima topoisomerasa II en la cepa JN362a. De todas formas para

confirmar que este compuesto no presenta inhibición de la enzima en esta cepa debería ser testeado a concentraciones menores que 1mM.

El compuesto **7** también presenta un perfil de inhibición de la enzima topoisomerasa II presente en la cepa de levaduras SC7K(*lys2-3*). Como el porcentaje de sobrevivencia de las células ts14-16 es de 35%, también se cree que esta molécula puede presentar otro mecanismo de acción que genere citotoxicidad.

El compuesto **5** no presenta un perfil de inhibición de la topoisomerasa II. De todas formas para confirmar los resultados obtenidos, se debería testear el compuesto a concentraciones menores.

Los compuestos **4** y **13** no presentan un perfil de inhibición de la topoisomerasa II.

### 5.2-Estudios de selectividad oxia – hipoxia de los derivados **7**, **10** y **13**.

Con el fin de tener una aproximación al mecanismo de acción de los nuevos derivados generados en el presente trabajo de tesis (**7**, **10** y **13**, figura 5.2.1), se realizan estudios de interacción con ADN (sección 5.2.1) y de bio-reducción en condiciones de normoxia/hipoxia (sección 5.2.2). De esta manera se busca comparar los diferentes agrupamientos químicos presentes en las cadenas laterales de los derivados generados.

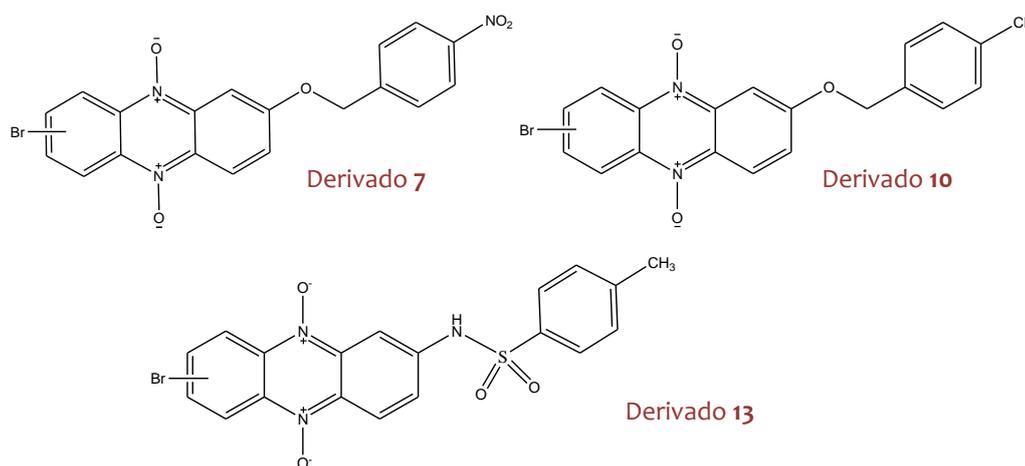


Figura 5.2.1- Estructuras de los derivados de  $N^5,N^{10}$ -dióxido de benciloxi (**7** y **10**) y sulfonamida fenazina (**13**).

### 5.2.1-Evaluación de la capacidad de interacción con ADN

En trabajos previos<sup>14</sup> nuestro grupo de investigación ha desarrollado derivados de  $N^5,N^{10}$ -dióxido de fenazina con capacidad de interacción con ADN, determinándose el grado de afinidad de los compuestos con la bio-molécula mediante espectroscopia de fluorescencia.

La técnica se basa en la capacidad intrínseca de los derivados  $N^5,N^{10}$ -dióxido de fenazina de emitir fluorescencia. El heterociclo fenazina es un fluoróforo fuerte, tanto por la predominante deslocalización electrónica, como por la presencia de heteroátomos en el anillo. Al excitar las moléculas, estas absorben un fotón pasando a un estado energético excitado. Las moléculas se desactivan regresando a su estado basal por fluorescencia. Otra vía de desactivación de las moléculas para que decaigan a su estado basal es el agregado de una segunda molécula desactivadora o *quencher*. El *quencher* (desactivador) forma un complejo con el fluoróforo, modificando sus características electrónicas. Esto permite que el retorno al estado basal tenga lugar sin la emisión de fluorescencia<sup>15</sup>.

De esta manera los derivados de  $N^5,N^{10}$ -dióxido de fenazina se incuban con diferentes concentraciones de ADN, y se mide la emisión de fluorescencia. Si la molécula se intercala en el ADN, éste actúa como *quencher*, disminuyendo la emisión de fluorescencia del derivado  $N^5,N^{10}$ -dióxido de fenazina. El fenómeno de *quencher* permite estudiar la interacción de ADN con moléculas que son potenciales agentes intercalantes, como el antitumoral azul de toluidina<sup>16</sup> (figura 5.2.1.1).

En el presente ensayo se incuban los derivados **7**, **10** y **13** con diferentes concentraciones de ADN de timo de ternera que van desde  $0\mu\text{M}$  hasta  $400\mu\text{M}$ .

La incubación se realiza en condiciones de normoxia, a  $37^\circ\text{C}$  por 30min. Se utiliza solución tampón fosfato pH=6 para simular las condiciones ácidas del ambiente tumoral<sup>17</sup>. Como control positivo se utiliza el agente intercalante azul de toluidina (TB)<sup>16</sup> (figura 5.2.1.1), y como blanco las soluciones de ADN en ausencia de compuesto. Una vez finalizada la incubación se irradia a la muestra con la longitud de onda de máxima absorción y se registra su espectro de emisión. En las figuras 5.2.1.2, 5.2.1.3, 5.2.1.4 y 5.2.1.5 se muestran los espectros de emisión del azul de toluidina y de los derivados **7**, **10** y **13**.

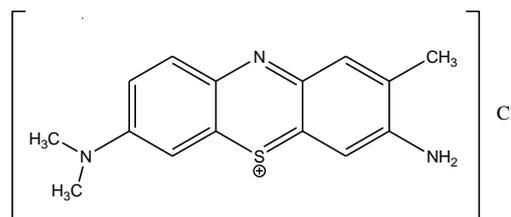


Figura 5.2.1.1- Estructura química del azul de toluidina

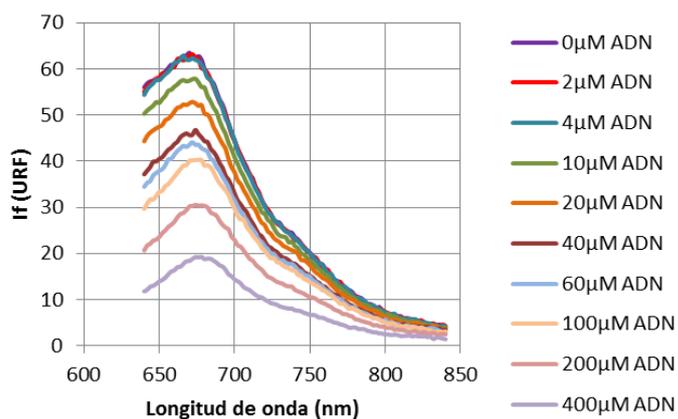


Figura 5.2.1.2- Espectros de emisión del azul de toluidina en presencia de diferentes concentraciones de ADN. La longitud de onda de excitación es 640nm.

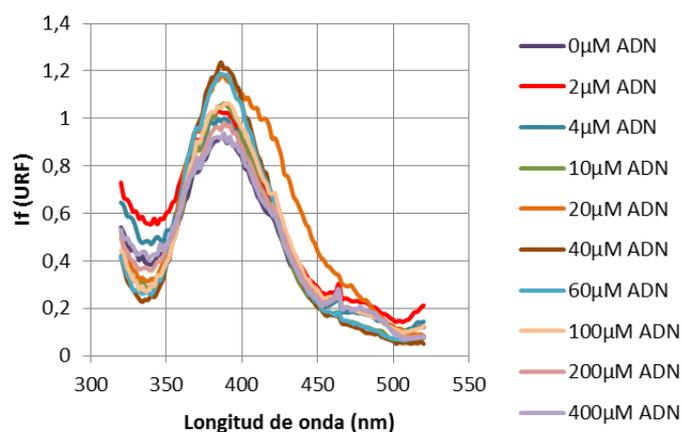


Figura 5.2.1.3- Espectros de emisión del derivado 7 en presencia de diferentes concentraciones de ADN. La longitud de onda de excitación es 240nm.

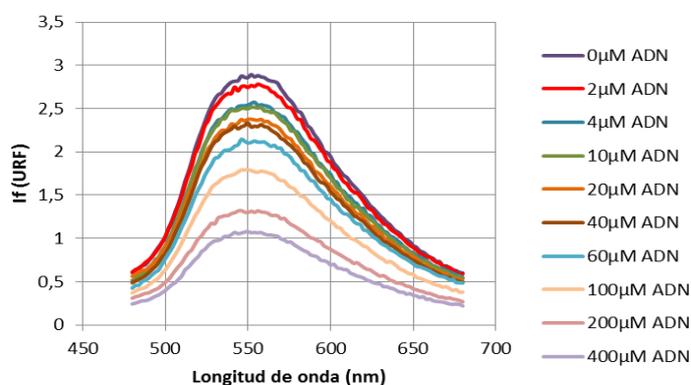


Figura 5.2.1.4- Espectros de emisión del derivado 10 en presencia de diferentes concentraciones de ADN. La longitud de onda de excitación es 275nm.

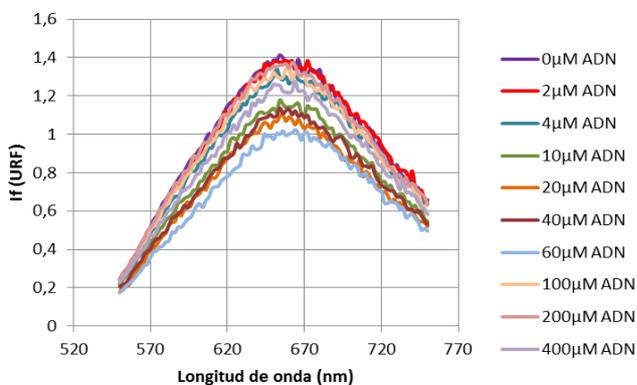


Figura 5.2.1.5- Espectros de emisión del derivado 13 en presencia de diferentes concentraciones de ADN. La longitud de onda de excitación es 390nm.

En el espectro de emisión del TB se observa un marcado descenso de la intensidad de fluorescencia (If) a medida que aumenta la concentración de ADN. Estos resultados reflejan

claramente que la molécula se intercala en el ADN, y que este último actúa como *quencher* disminuyendo la emisión de fluorescencia. Este mismo comportamiento puede observarse para el derivado **10**. Sin embargo esta apreciación no se observa en los espectros de emisión de los derivados **7** y **13**. En estos últimos no se observa un descenso en la  $I_f$  a medida que aumenta la concentración de ADN. Estos resultados indican en una primera instancia que el derivado **7** y **13** no interaccionarían con la bio-molécula.

A partir de los espectros de emisión es posible determinar la longitud de onda máxima de emisión. Si se grafica la  $I_f$  a dicha longitud de onda en función de la concentración de ADN, se esperaría observar un gráfico de saturación para los compuestos que interaccionen con la bio-molécula. Para determinar el grado de afinidad del TB y de los derivados **7**, **10** y **13** con el ADN se recurre al análisis de Stern-Volmer. Este análisis se aplica a los primeros puntos gráfico, donde todavía no se observa saturación. La ecuación de Stern-Volmer es  $I_f^0 / I_f^Q = 1 + K_{sv} [Q]$ .  $I_f^0$  es la intensidad de fluorescencia en ausencia de *quencher*, es decir en ausencia de ADN;  $I_f^Q$  es la intensidad de fluorescencia en presencia de ADN, por este motivo se escribirá  $I_f^{ADN}$ ;  $[Q]$  corresponde a la concentración de ADN. La pendiente del gráfico  $I_f^0 / I_f^{ADN}$  vs  $[ADN]$  se denomina constante de Stern-Volmer ( $K_{sv}$ ), y es una medida de la desactivación que sufre el compuesto por la bio-molécula<sup>16</sup>. Esta constante está directamente relacionada con la afinidad que tiene el compuesto por el ADN.

En la figuras 5.2.1.6, 5.2.1.7, 5.2.1.8 y 5.2.1.9 se muestran los gráficos de intensidad de fluorescencia en función de la concentración de ADN, y el gráfico de Stern-Volmer, para el TB y los diferentes derivados respectivamente.

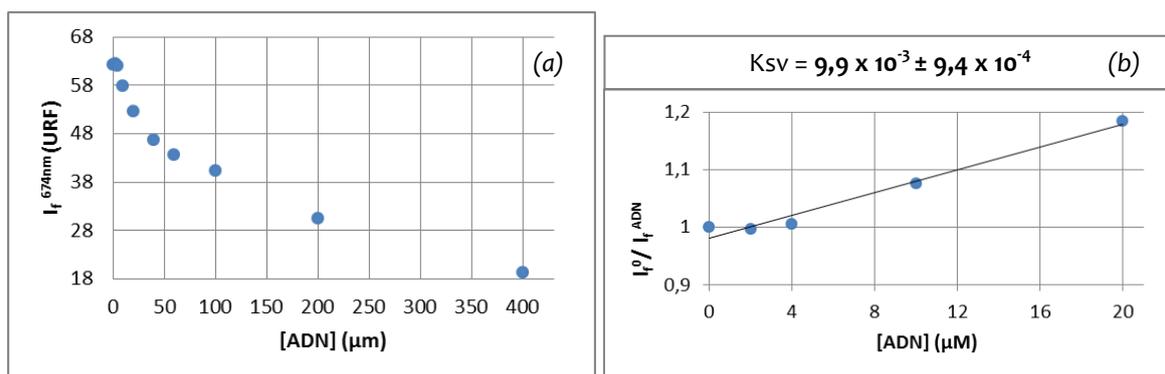


Figura 5.2.1.6- Gráficos correspondientes al TB. (a) Gráfico de intensidad de fluorescencia a la longitud de onda de máxima emisión (674nm) en función de la concentración de ADN. (b) Gráfico de Stern-Volmer, la pendiente corresponde  $K_{sv}$ .

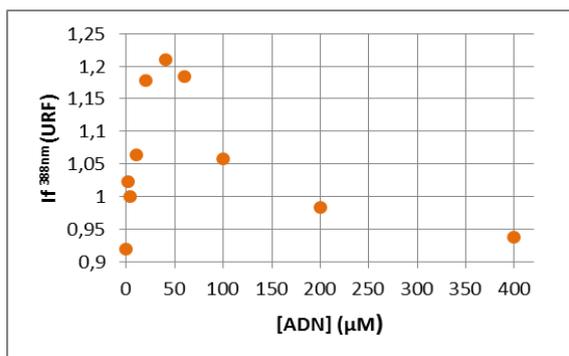


Figura 5.2.1.7- Gráfico de intensidad de fluorescencia del derivado 7 a la longitud de onda de máxima emisión (388nm) en función de la concentración de ADN. En este caso no se realiza el análisis de Stern-Volmer

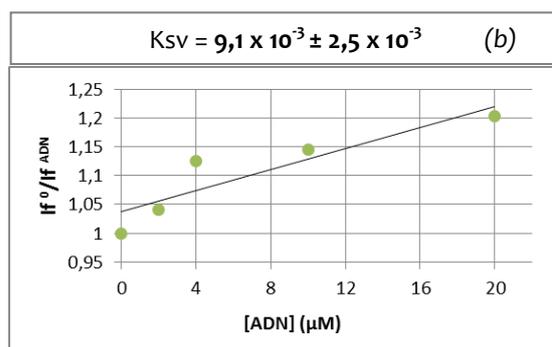
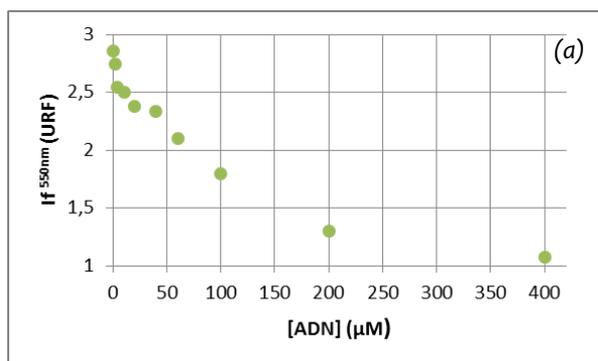


Figura 5.2.1.8- Gráficos correspondientes al derivado 10. (a) Gráfico de intensidad de fluorescencia a la longitud de onda de máxima emisión (550nm) en función de la concentración de ADN. (b) Gráfico de Stern-Volmer, la pendiente corresponde Ksv.

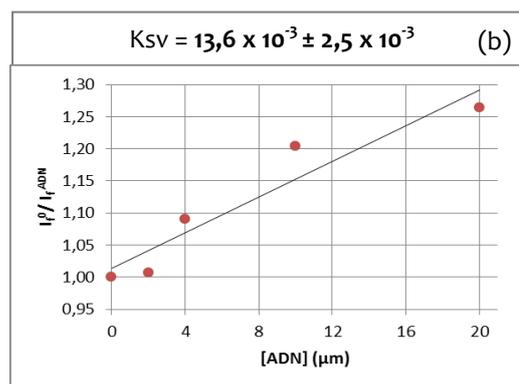
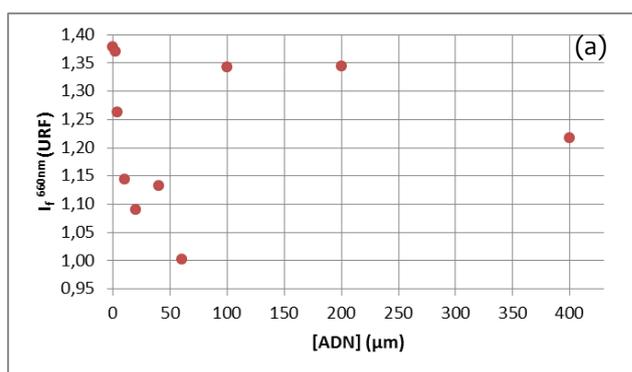


Figura 5.2.1.9- Gráficos correspondientes al derivado 13. (a) Gráfico de intensidad de fluorescencia a la longitud de onda de máxima emisión (660nm) en función de la concentración de ADN. (b) Gráfico de Stern-Volmer, la pendiente corresponde Ksv.

En la figura 5.2.1.6 (a) se puede observar que el azul de toluidina, el cual se utiliza como control positivo, tiene un comportamiento clásico, ya que la intensidad de fluorescencia desciende de forma pronunciada con concentraciones crecientes de ADN. Este comportamiento también se

observa para el derivado **10** (figura 5.2.1.8, a). La  $K_{sv}$  calculada para el TB es  $9,9 \times 10^{-3}$ . Esta constante es del mismo orden que la del derivado **10**, cuya  $K_{sv}$  es  $9,1 \times 10^{-3}$ . Estos resultados indicarían que ambos compuestos interaccionan con el ADN con el mismo grado de afinidad.

Por otro lado, en la figura 5.2.1.7 se puede observar el comportamiento del derivado **7**, el cual claramente no interacciona con la bio-molécula, ya que su comportamiento es muy diferente al TB. Para compuestos que no interaccionan con el ADN se espera un gráfico de  $I_f$  vs. [ADN] constante, en donde el valor de  $K_{sv}$  es 1. En cambio, en el gráfico del derivado **7** se observa que a medida que aumenta la concentración de ADN aumenta la  $I_f$  hasta una concentración de ADN  $60\mu\text{M}$ . Este comportamiento podría deberse a una agregación del compuesto por apilamiento, debido a interacciones  $\pi$  *stacking* entre las estructuras planas de los heterociclos de fenazina. Este apilamiento dejaría de generarse a concentraciones de ADN mayores a  $60\mu\text{M}$ , en donde la  $I_f$  disminuye. El hecho de que la  $I_f$  no disminuya al agregar la bio-molécula es un claro indicador de que la misma no actúa como *quencher*, mostrando que el derivado **7** no interacciona con el ADN. Por esta razón no se realiza para este compuesto el análisis de Stern-Volmer.

En la figura 5.2.1.9 se observa el comportamiento del derivado **13**. Para este compuesto se obtuvo una  $K_{sv}$  cuyo valor es  $13,6 \times 10^{-3}$ . Esta constante es mayor que la  $K_{sv}$  que se obtuvo para el TB, que es el compuesto control. Estos resultados indicarían que el derivado **13** presenta más interacción con la bio-molécula que el TB. Sin embargo el gráfico de  $I_f$  vs. [ADN] para el derivado **13** (figura 5.2.1.9, a), no presenta un comportamiento clásico. Si se observa la  $I_f$  para el rango de concentraciones de ADN desde  $0\mu\text{M}$  a  $60\mu\text{M}$ , con excepción del punto correspondiente a  $40\mu\text{M}$ , hay un descenso de la  $I_f$  con concentraciones crecientes de ADN. En este rango la curva se asemeja al comportamiento del TB. La disminución de la intensidad de fluorescencia es mínima si se compara con el control, pero hay que tener en cuenta que el derivado **13** presenta una intensidad de fluorescencia intrínseca mucho menor que el TB ( $62,2$  y  $1,38$  respectivamente).

La intensidad de fluorescencia del derivado **13** para las concentraciones de ADN  $100\mu\text{M}$ ,  $200\mu\text{M}$  y  $400\mu\text{M}$  aumenta de manera significativa con respecto a concentraciones menores de ADN. Este comportamiento no es el esperado, pero es predecible si se observa el espectro de emisión (figura 5.2.1.5), ya que en el mismo se registra la menor  $I_f$  a una concentración  $60\mu\text{M}$  de ADN. Igual que lo que sucede con el compuesto **7**, este comportamiento podría deberse a que moléculas del derivado **13** interaccionen entre sí por apilamiento, en este caso a altas concentraciones de ADN. De esta manera no interacciona con la bio-molécula e incrementa su intensidad de fluorescencia respecto a concentraciones de ADN menores.

### En resumen

De los tres derivados de  $N^5, N^{10}$ -dióxido de fenazina estudiados, sólo el derivado **7** no presenta interacción con el ADN. El derivado **13** presenta interacción con el ADN en el rango de concentraciones entre  $0\mu\text{M}$  y  $60\mu\text{M}$ . A concentraciones mayores de ADN no se observa interacción con la biomolécula. Se cree que esto puede deberse a un fenómeno de apilamiento entre los heterociclos de fenazina. Este fenómeno se piensa que también lo sufre el derivado **7**, ya que aumenta su  $I_f$  a concentraciones crecientes de ADN. De todas formas para confirmar el fenómeno de apilamiento son necesarios estudios más profundos.

El derivado **10** mostró un comportamiento similar al TB, y los resultados indicarían que este derivado interacciona con el ADN con un grado de afinidad similar al control.

#### **5.2.2-Ensayo *in vitro* de bio-reducción en condiciones de normoxia/hipoxia.**

El ensayo *in vitro* de bio-reducción se lleva a cabo para conocer si los derivados **7**, **10** y **13**, figura 5.2.1, página 82) pueden ser reducidos por la acción de enzimas celulares. El mismo se realiza en condiciones de normoxia/hipoxia con el objetivo de conocer si estos derivados presentan un perfil de bio-reducción selectivo en hipoxia. La realización de este ensayo sólo fue posible para el derivado **13**, ya que con la metodología empleada los compuestos **7** y **10** precipitaban en la solución tampón utilizada.

El ensayo se realiza incubando al derivado **13** con tres fracciones celulares diferentes obtenidas de un homogeneizado de hepatocitos de rata. La fracción microsomal, enriquecida en enzimas presentes en el retículo endoplásmico; la fracción citoplásmica, enriquecida en enzimas localizadas en el citosol; y fracción S<sub>9</sub> que contiene enzimas presentes en el citosol y en la mitocondria, pero en menor concentración que las fracciones citoplásmicas y mitocondriales respectivamente. Utilizando estas tres fracciones celulares se tiene un amplio espectro de las enzimas presentes en la célula, para así detectar cualquier reducción enzimática a la cual este expuesto el compuesto. Algunas de las enzimas presentes en el homogeneizado que se han identificado como responsables de la bio-reducción de grupos  $N$ -óxido son: citocromo P450, xantino oxidasa, DT-diaforasa y aldehído oxidasa<sup>18-21</sup>.

Las diferentes fracciones celulares se incuban con el derivado **13** por 30 min a  $37^\circ\text{C}$  en presencia y en ausencia de oxígeno. Además se realiza un control en donde se incuban todos los reactivos menos el derivado **13**. El control se realiza para asegurarse que todo lo que se siembra en la CCF corresponde a metabolitos extraídos de la bio-reducción del derivado **13**, y

no a los reactivos. Posteriormente a la incubación, se inactiva la fracción y se extraen por reparto los productos de metabolización. Se comparan los metabolitos con el producto obtenido por reducción química (derivado **14**, página 65, figura 4.4.3) mediante CCF.

### Hipoxia

Los resultados de la incubación en condiciones de hipoxia se observan en la figura 5.2.2.1.

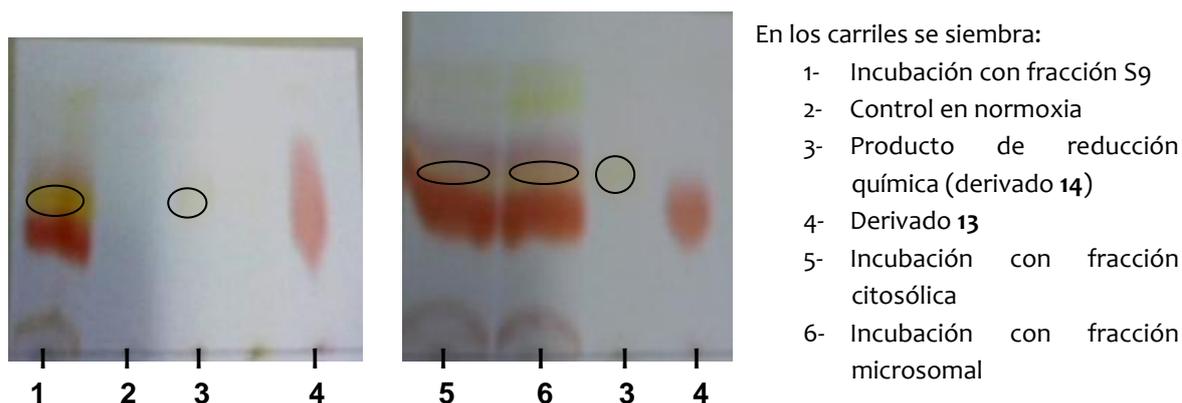


Figura 5.2.2.1- Resultados de la bio-reducción en condiciones de hipoxia. La CCF se realiza en alúmina;  $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$ , 99:1. Los círculos resaltan el metabolito obtenido por bio-reducción que coincide en  $R_f$  con el producto obtenido por reducción química.

Los resultados obtenidos de la bio-reducción en condiciones de hipoxia muestran que el derivado **13** sufre reducción enzimática, por las enzimas presentes en las tres fracciones celulares. En los carriles 1, 5 y 6 se pueden observar los diferentes metabolitos obtenidos de la reducción enzimática, aunque también se observa la presencia del derivado **13** sin reducirse. De todos los metabolitos generados en la bio-reducción se identifica al metabolito que coincide en  $R_f$  con el producto obtenido por reducción química (fenazina de oxigenada **14**). El metabolito identificado y el derivado **14** presentan un color similar a la luz visible, excepto en la fracción S9, el cual presenta un color más amarillo (figura 5.2.2.1).

El control (carril 2, figura 5.2.2.1) no presenta ninguna mancha, esto indica que en las extracciones no hay restos de reactivos que puedan aparecer en la CCF, y confundirse con metabolitos bio-reducidos.

Para conocer de forma cualitativa si el metabolito generado se corresponde con el derivado **14** se revela con anisaldehído (figura 5.2.2.2).

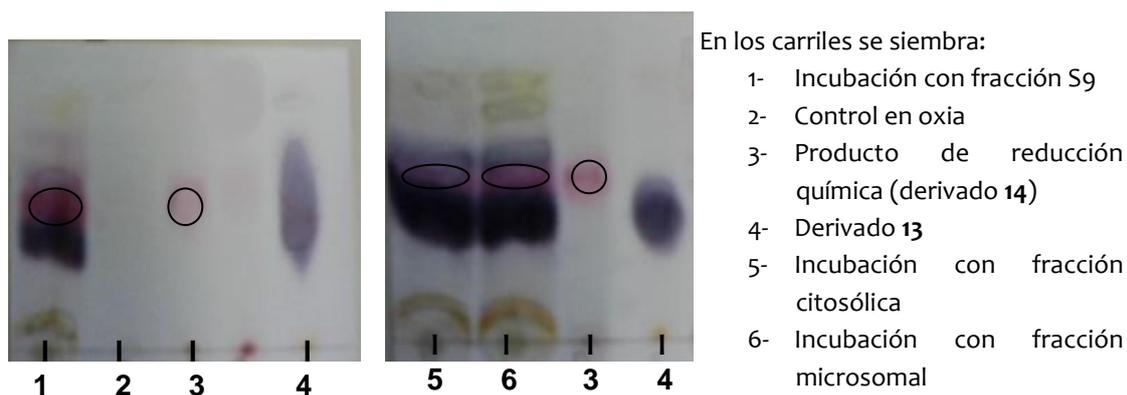


Figura 5.2.2.2- Resultados de la bio-reducción en condiciones de hipoxia. La CCF se realiza en alúmina;  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ : MeOH, 99:1, se revela con anisaldehído. Los círculos resaltan el metabolito obtenido por bio-reducción que coincide en Rf con el producto obtenido por reducción química.

El revelado de la CCF con anisaldehído permite observar que el metabolito que coincide en Rf con el derivado 14, revela el mismo color que el producto obtenido por reducción química (derivado 14). El color que presentan al revelar con anisaldehído es fucsia-violeta. Este metabolito presenta el mismo color al revelado en las tres fracciones celulares (carril 1, 5 y 6, figura 5.2.2.2).

Estas observaciones indicarían que el metabolito presente en las tres fracciones celulares es el mismo derivado de-oxigenado que el derivado 14. Por lo mismo se podría afirmar que hay bio-reducción en condiciones de hipoxia.

#### Normoxia

En condiciones de normoxia los resultados fueron muy similares a los obtenidos en la bio-reducción en condiciones de hipoxia (figura 5.2.2.3).

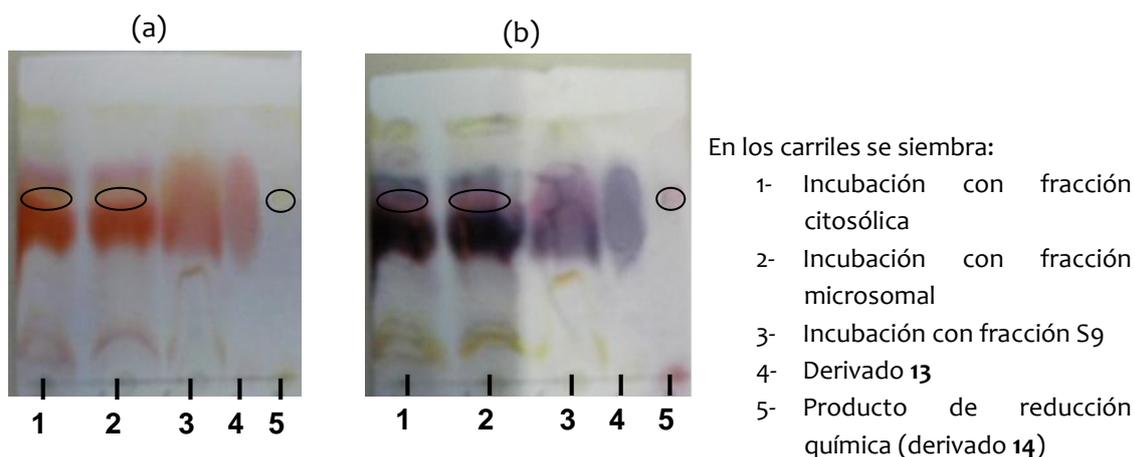


Figura 5.2.2.3- Resultados de la bio-reducción en condiciones de normoxia. (a) CCF en alúmina;  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ : MeOH, 99:1, vista a la luz visible. (b) CCF revelada con anisaldehído. Los círculos resaltan el metabolito obtenido por bio-reducción que coincide en  $R_f$  con el producto obtenido por reducción química.

Los resultados de la incubación en normoxia muestran que el derivado **13** sufre reducción enzimática. Al igual que en la bio-reducción en condiciones de hipoxia, se obtienen varios metabolitos de la reacción y se observa la presencia del derivado **13** sin reducirse (figura 5.2.2.3 (a) carril 1, 2 y 3). Se identifica al metabolito que coincide en  $R_f$  con el derivado **14**. En las fracciones microsomal y citosólica se observa que el metabolito y el producto de reducción química tienen un color a la luz visible similar. En la fracción S9 no se distingue una marca como en las otras fracciones (figura 5.2.2.3 (a), carril 3), aunque si se observa detenidamente se puede ver una marca difusa color naranja pálido, que se mezcla con el color rojo correspondiente al derivado **13**. Este color naranja pálido es igual al del metabolito identificado en las fracciones microsomal y citosólica. Por lo tanto puede ser que el mismo también esté presente en la fracción S9, pero no se puede determinar con claridad. Lo que sucede es que el derivado **13** y el derivado **14** tienen un  $R_f$  similar en la CCF.

Para conocer cualitativamente si el metabolito obtenido por bio-reducción se corresponde con el producto obtenido por reducción química, se revela con anisaldehído (figura 5.2.2.3 (b)). El revelado de la CCF con anisaldehído muestra al igual que el revelado en condiciones de hipoxia, que el metabolito identificado coincide en  $R_f$  con el derivado **14** revela el mismo color, un color fucsia-violeta (figura 5.2.2.3 (b) carril 1, 2). Como se comentaba anteriormente la excepción se da en la fracción S9 (figura 5.2.2.3 (b) carril 3), en donde no se observa una marca definida correspondiente al metabolito. De todas formas si se observa con atención se puede ver una marca del mismo  $R_f$  que el derivado **14** de color fucsia-violeta pero de forma difusa.

Estas observaciones indicarían que el metabolito presente en las tres fracciones celulares es el mismo derivado reducido que el derivado **14**. Por lo mismo se podría afirmar que hay bio-reducción en condiciones de normoxia.

#### En resumen

Se observa que existe reducción enzimática del derivado **13** en condiciones de hipoxia y de normoxia. El metabolito generado en ambas condiciones, y presente en las tres fracciones celulares se corresponde con el producto obtenido por reducción química (derivado **14**). Es entonces que se concluye que la bio-reducción del derivado **13** no es selectiva en hipoxia.

#### **Bibliografía**

- 1- Nitiss, J; Liu, Y; Hsiung, Y. A temperature sensitive topoisomerase II allele confers temperature dependent drug resistance on amsacrine and etoposide: a genetic system for determining the targets of topoisomerase II inhibitors. *Cancer Research*. 53 (1), 89-93, 1993.
- 2- Lillo, O; Bracesco, N; Nunes, E. Lethal and mutagenic interactions between c-rays, cisplatin and etoposide at the cellular and molecular levels. *International Journal of Radiation Biology*. 87 (2), 222-230, 2011.
- 3- Spor, A; Nidelet, T; Simon, J; Bourgeois, A; de Vienne, D; Sicard, D. Niche-driven evolution of metabolic and life-history strategies in natural and domesticated populations of *Saccharomyces cerevisiae*. *Bio Med Central Evolutionary Biology*. 9:296, 2009.
- 4- Haurie, V; Perrot, M; Mini, T; Jenou, P; Saggiocco, F; Boucherie, H. The transcriptional activator Cat8p provides a major contribution to the reprogramming of carbon metabolism during the diauxic shift in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*. 276 (1), 76-85, 2001.
- 5- Lavaggi, M.L. “Hipóxia como diana terapéutica para el tratamiento de tumores sólidos: desarrollo de profármacos selectivos de N-N’ dióxido de fenazina”. Tesis de Doctorado en Química. Facultad de Química. UdelaR. 2009. Montevideo, Uruguay.

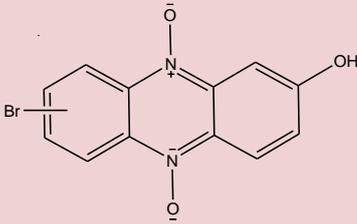
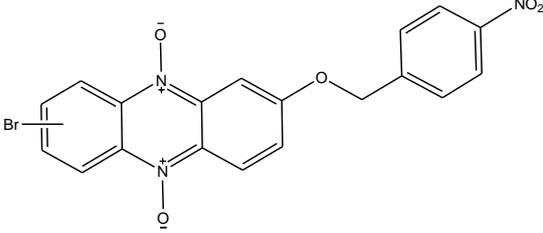
- 6- Cerecetto, H; González, M; Lavaggi, M. L; Azqueta, A; López de Cerain, A; Monge, A. Phenazine 5, 10-dioxide derivatives as hypoxic selective cytotoxins. *Journal of Medicinal Chemistry*. 48 (1), 21-23, 2005.
- 7- Werner-Washburne, M; Braun, E; Crawford, M; Peck, V. Stationary phase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Microbiology*. 19 (6), 1159-1166, 1996.
- 8- Nitiss, J. Using yeast to study resistance to topoisomerase II-targeting drugs. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*. 34, S 6-S 13, 1994.
- 9- Aye, M; Di Giorgio, C; De Mo, M; Botta, A; Perrin, J; Courbiere, B. Assessment of the genotoxicity of three cryoprotectants used for human oocyte vitrification: Dimethyl sulfoxide, ethylene glycol and propylene glycol. *Food and Chemical Toxicology*. 48 (7), 1905-1912, 2010.
- 10- Panek, A. D; Poppe, S; Panek, A.D; Junqueira, V. Effect of dimethylsulfoxide on signal transduction in mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 23 (2), 105-111, 1990.
- 11- Contopoulou, C; Cook, V; Mortimer, R. Analysis of DNA double strand breakage and repair using orthogonal field alternation gel electrophoresis. *Yeast*. 3 (2), 71-76, 1987.
- 12- Wilstermann, A; Bender, R; Godfrey, M; Choi, S; Anklin, C; Berkowitz, D; Osheroff, N; Graves, D. Topoisomerase II-drug interaction domains: identification of substituents on etoposide that interact with the enzyme. *Biochemistry*. 46 (28), 8217-8225, 2007.
- 13- Rasheed, Z.A; Rubin, E.H.. Topoisomerase-interacting agents, *Cancer; principles and practice of oncology*. Editor DeVita, V; Lawrence, T; Rosenberg, S. 9 ed, Lippincott Williams & Wilkins, 2011; Philadelphia, USA.
- 14- Nieves, M. “Derivados N-N’ dióxido de fenazina como agentes bio-reducibles en hipoxia que interaccionan con el ADN”. Tesis de Licenciatura en Bioquímica. Facultad de Ciencias. UdelaR. 2012, Montevideo, Uruguay.
- 15- Van Holde, K; Curtis Johnson, W; Shing Ho, P. *Principles of Physical Biochemistry*. Prentice Hall, 2006; New Jersey, USA.
- 16- Wang, J; Yang, X. Multiplex binding modes of toluidine blue with calf thymus DNA and conformational transition of DNA revealed by spectroscopic studies.

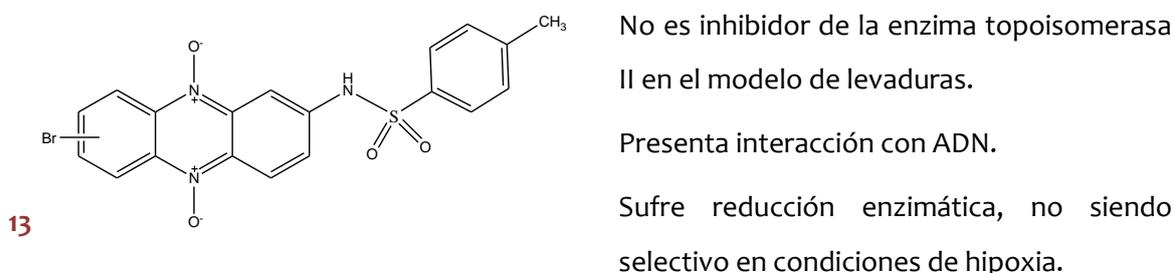
- Spectrochimica Acta. Part A, Molecular and Biomolecular Spectroscopy.* 74 (2), 421–426, 2009.
- 17- Gatenby, R; Gillies, R. Why do cancer have high aerobic glycolysis? *Nature Reviews Cancer.* 4 (11), 891-899, 2004.
- 18- Kim, J; Patterson, A; Stratford I; Hendry J. The importance of DT-diaphorase and hypoxia in the cytotoxicity of RH1 in human breast and non-small cell lung cancer cell lines. *Anticancer Drugs.* 15 (1), 71-77, 2004.
- 19- Wilson, W; Hicks. K; Pullen, S; Ferry, D; Helsby, N; Patterson, A. Bystander effects of bioreductive drugs: potential for exploiting pathological tumor hypoxia with dinitrobenzamide mustards. *Radiation Research.* 167 (6), 625-636,2007.
- 20- Ganley, B; Chowdhury, G; Bhansali, J; Daniels, J; Gates, K. Redox-activated, hypoxia-selective DNA cleavage by quinoxaline 1,4-di-N-oxide. *Bioorganic and Medicinal Chemistry.* 9 (9), 2395-2401, 2001.
- 21- Lavaggi, M; Cabrera, M; Cerecetto, H; González, M. Differential enzymatic reductions governing the differential hypoxia-selective cytotoxicities of phenazine 5,10-dioxides. *Chemical Research in Toxicology,* 21, 1900-1906, 2008.

## CONCLUSIONES

- Se han podido sintetizar y caracterizar los derivados de  $N^5,N^{10}$ -dióxido de bencilamino (**11**), benciloxi (**7** y **10**) y sulfonamida fenazina (**13**), mediante síntesis asistida por microondas y por vía tradicional. Logrando reducir los tiempos de reacción y aumentado los rendimientos mediante la síntesis asistida por microondas de los derivados **7**, **10** y **13**.
- Se sintetizó con rendimiento moderado el producto mono-reducido (**14**) del derivado **13**.
- Se logró la puesta a punto del ensayo de inhibición de la topoisomerasa II en levaduras. De los compuestos ensayados se observó que los derivados **1** y **7** presentan inhibición de la enzima en la cepa SC7K(lys2-3).
- Los derivados **10** y **13** presentaron interacción con ADN, siendo la afinidad de interacción igual o mayor a la que presenta el azul de toluidina. De esta manera se observa que los agrupamientos 4-Cl-bencilo y 4-metilfenilsulfonamida estarían involucrados en la interacción con la bio-molécula.
- En el estudio de la bio-reducción en condiciones de oxia/hipoxia del derivado **13** se concluye que el mismo sufre bio-reducción en ambas condiciones, por lo cual no presenta selectividad en hipoxia.

### En resumen

Compuestos	Resultados
<p><b>1</b></p> 	<p>Presenta inhibición de la enzima topoisomerasa II en la cepa de levaduras SC7K(lys2-3).</p>
<p><b>7</b></p> 	<p>Presenta inhibición de la enzima topoisomerasa II en la cepa de levaduras SC7K(lys2-3).</p> <p>No interacciona con el ADN.</p>



### Perspectivas

- Los derivados que presentan inhibición de la enzima topoisomerasa II en levaduras, son derivados de  $N^5, N^{10}$ -dióxido de hidroxil (1) y benciloxi (7) fenazina. Estos compuestos poseen una estructura fenazina en común, la cual tiene un átomo de bromo en la posición 7(8), y un átomo de oxígeno en la posición 2. Estas características comunes, es decir, el esqueleto fenazina, podría ser quien esté involucrado en el mecanismo de inhibición de la enzima. Este mecanismo de inhibición no estaría dado por la intercalación del esqueleto fenazina en el ADN, ya que estudios anteriores al presente trabajo de tesis sugieren que el compuesto 1 no es buen agente intercalante. A su vez el compuesto 7 no presenta interacción con ADN. Por lo tanto estos compuestos podrían ser venenos de la topoisomerasa II no intercalantes o inhibidores catalíticos. De todas formas habría que realizar estudios más profundos para poder elucidar este hecho.
- El derivado 10 al igual que el compuesto 7 es un derivado de  $N^5, N^{10}$ -dióxido de benciloxi fenazina. Este derivado a diferencia del derivado 7 presenta interacción con ADN. Esta propiedad estaría asociada al agrupamiento 4-clorofenilo que se encuentra en su cadena lateral. Como perspectiva sería interesante incluirlo en el ensayo de inhibición, para así determinar si es inhibidor de la enzima, y en el caso de serlo si la propiedad de interacción con ADN podría interferir positiva o negativamente a la inhibición.
- El derivado 13 presenta interacción con ADN. Esta propiedad podría estar asociada al agrupamiento 4-metilfenilsulfonamida que se encuentra en su cadena lateral. Sería

promisorio continuar trabajando con este derivado, generando modificaciones estructurales a nivel del esqueleto fenazina para lograr la selectividad de bio-reducción en condiciones de oxia/hipoxia. De esta forma podría generar citotoxicidad por intercalación en el ADN y por la generación de especies citotóxicas bajo condiciones hipóxicas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### **7.1-Síntesis y caracterización espectroscópica**

Los disolventes se destilan previo a su uso. Se utilizan reactivos comerciales: ALDRICH, JANSSEN, MERCK, FLUKA, entre otros. El avance de las reacciones y la pureza de los productos se examinan por cromatografía en capa fina (CCF). Se utiliza silicagel o alúmina con indicador fluorescente en placas de poliéster o de aluminio. Los cromatogramas se revelan por alguno de los siguientes métodos: exposición a la luz ultravioleta a 254 nm, asperjado con una mezcla de etanol:ácido sulfúrico:anisaldehído (95:4:1) (v/v/v) y posterior quemado, exposición a vapores de yodo. Para las cromatografías en columna (CC) se utiliza silicagel (Merck, 60-230 mesh).

Las reacciones mediante síntesis asistida por microondas se realizan en un reactor de digestión enzimática WX-4000, EU Chemical instruments.

Los espectros de  $^1\text{H}$  RMN y  $^{13}\text{C}$  RMN se realizan en un equipo BRUKER DPX-400 (400 MHz), utilizando tetrametilsilano como referencia interna. Los disolventes deuterados utilizados son: dimetilsulfóxido, cloroformo. Los desplazamientos químicos se expresan en ppm, las multiplicidades se designan como: **s** singulete, **d** doblete, **t** triplete, **c** cuarteto, **m** multiplete, **sa** señal ancha. Las secuencias de pulsos de los experimentos HMQC, HMBC, utilizados son los disponibles en el software del equipo. Los espectros de masa (EM) se realizan en un espectrómetro de masas SHIMADZU GC-MS QP 1100 EX. Se realizan ionizaciones de la muestra por impacto electrónico a 70eV.

#### Preparación de derivados de 1-óxido de benzo[1,2-c]1,2,5-oxadiazol<sup>1-3</sup>

Se añade la 2-nitroanilina correspondiente (17 mmol) a una mezcla de hidróxido de sodio (17 mmol) en etanol (50 mL). Se agita la suspensión durante 5 min, se enfría en baño de hielo y se añade una solución de hipoclorito de sodio (30 mmol). El sólido obtenido se filtra y se lava con etanol frío. El sólido resultante es filtrado y secado a vacío a 20 °C.

#### Preparación de derivados de $N^5,N^{10}$ -dióxido de 2(3)-hidroxifenazina<sup>4,5</sup>, 1-3.

Bajo atmósfera de nitrógeno, se prepara metóxido de sodio disolviendo 3.9 mmol de sodio en 25 mL de metanol anhidro, en baño de hielo a -5 °C. Por otro lado, se disuelve en 5 mL de metanol anhidro y 30 mL tetrahidrofurano anhidro, 20 mmol del 1-óxido de benzo[1,2-c]1,2,5-oxadiazol correspondiente y 20 mmol de *p*-hidroxifenol, en baño de hielo a -5 °C bajo

atmósfera de nitrógeno. La mezcla anterior se vuelca lentamente sobre la solución de metóxido de sodio a  $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Se agita a temperatura ambiente durante 24 h y posteriormente se mantiene a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  por otras 24 h. El sólido resultante se filtra y se lava exhaustivamente con hexano hasta obtener un sólido cristalino.

Preparación de derivados de  $N^5, N^{10}$ -dióxido de 2(3)-aminofenazina<sup>4,5</sup>, 4 y 5.

Bajo atmósfera de nitrógeno, se prepara metóxido de sodio disolviendo 3.9 mmol de sodio en 25 mL de metanol anhidro, en baño de hielo a  $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Por otro lado, se disuelve en 5 mL de metanol anhidro y 30 mL tetrahidrofurano anhidro, 20 mmol del 1-óxido de benzo[1,2-c]1,2,5-oxadiazol correspondiente y 20 mmol de *p*-aminofenol, en baño de hielo a  $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$  bajo atmósfera de nitrógeno. La mezcla anterior se vuelca lentamente sobre la solución de metóxido de sodio a  $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Se agita a temperatura ambiente durante 24 h y posteriormente se refrigera a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  por otras 24 h. El sólido resultante se filtra y se lava exhaustivamente con hexano hasta obtener un sólido cristalino.

Preparación del derivado de  $N^5, N^{10}$ -dióxido de 7(8)-bromo-2-[2-(4-nitrobencil-1-il)]oxifenazina, 7<sup>6</sup>.

A una disolución de 0.65 mmol de  $N^5, N^{10}$ -dióxido de 7(8)-bromo-2-hidroxifenazina en  $\text{CH}_3\text{CN}$  se adicionan 0.65 mmoles de bromuro de 4-nitrobencilo y 0.65 mmol de  $\text{K}_2\text{CO}_3$ . El agregado se realiza en un vial de microondas a temperatura ambiente. El microondas se programa a  $120^{\circ}\text{C}$ , 5atm, 300watts. El tiempo de reacción es de 22 min. Posteriormente, se extrae con acetato de etilo/ácido clorhídrico, obteniendo en la fase orgánica un producto que se purifica por CC ( $\text{SiO}_2$ , acetato de etilo:hexanos; 6:4) que se corresponde con el producto deseado.

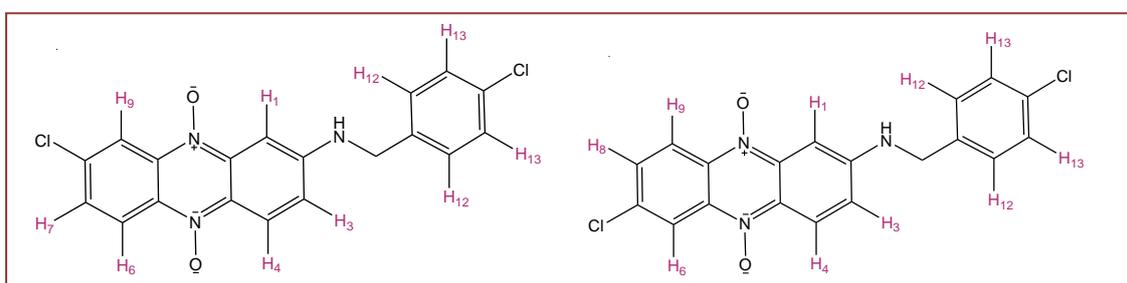
Preparación del derivado de  $N^5, N^{10}$ -dióxido de 7(8)-bromo-2-[2-(4-clorobencil-1-il)]oxifenazina, 10<sup>6</sup>.

A una disolución de 0.81 mmol de  $N^5, N^{10}$ -dióxido de 7(8)-bromo-2-hidroxifenazina en  $\text{CH}_3\text{CN}$  se adicionan 0.81 mmol de cloruro de 4-clorobencilo, 0.81 mmol de  $\text{K}_2\text{CO}_3$ , 0.81 mmol de 18-C-6 y 0.081 mmol de yoduro de tetrabutilamonio. El agregado se realiza en un vial de microondas a temperatura ambiente. El microondas se programa a  $120^{\circ}\text{C}$ , 8atm, 700watts. El tiempo de reacción es 20 min. Posteriormente, se extrae con acetato de etilo/ácido clorhídrico, obteniendo en la fase orgánica un producto que se purifica por CC ( $\text{SiO}_2$ , acetato de etilo:hexanos; 6:4) que se corresponde con el producto deseado.

Preparación del derivado de  $N^5, N^{10}$ -dióxido de 7(8)-cloro-2-[2-(4-clorobencil-1-il)]aminofenazina,

**11.**

A una disolución de 0.19 mmol de  $N^5, N^{10}$ -dióxido de 7(8)-cloro-2-aminofenazina en  $\text{CH}_3\text{CN}$  se adicionan 0.19 mmol de cloruro de 4-clorobencilo, 0.19 mmol de  $\text{K}_2\text{CO}_3$ , 0.19 mmol de 18-C-6 y 0.019 mmol de ioduro de tetrabutilamonio. El agregado se realiza en un vial de microondas a temperatura ambiente. El microondas se programa a  $120^\circ\text{C}$ , 8atm, 700watts. El tiempo de reacción es 20 min. Posteriormente, se extrae con acetato de etilo/ácido clorhídrico, obteniendo en la fase orgánica un producto que se purifica por CC ( $\text{SiO}_2$ , acetato de etilo:hexanos; 6:4) que se corresponde con el producto deseado.

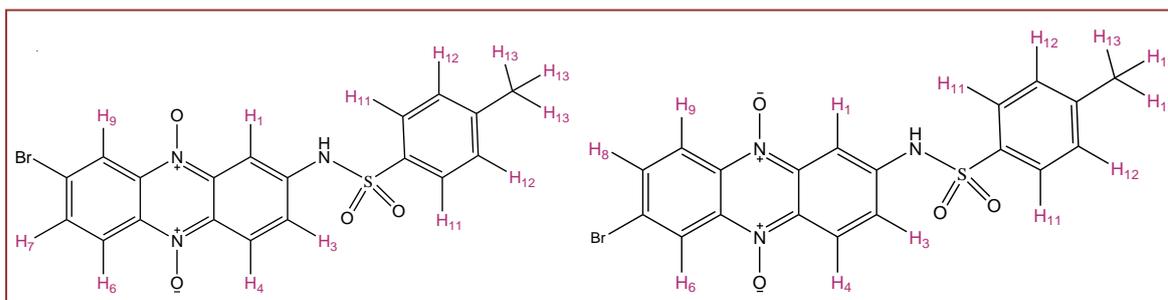


**$N^5, N^{10}$ -dióxido de 7(8)-cloro-2-[2-(4-clorobencil-1-il)]aminofenazina, 11.** Proporción 7-isómero:8-isómero (5.6:4.4). Rendimiento 7%. Sólido violeta. MS, m/z (%): 368 (M- O., 1.00), 257 (1.00), 245 (2.50).  $^1\text{H}$  RMN 7-isómero ( $\text{CDCl}_3$ , 400MHz)  $\delta$ : 4.50 (1H, s,  $\text{H}_{11}$ ), 7.22-7.36 (2H, m,  $\text{H}_{12} + \text{H}_{13}$ ), 7.63-7.72 (2H, m,  $\text{H}_1 + \text{H}_3$ ), 7.99-8.03 (2H, m,  $\text{H}_6 + \text{H}_8$ ), 8.61-8.68 (1H, m,  $\text{H}_4$ ), 8.54 (1H, d,  $\text{H}_9$   $J=9.2\text{Hz}$ ).  $^1\text{H}$  RMN 8-isómero ( $\text{CDCl}_3$ , 400MHz)  $\delta$ : 4.73 (1H, s,  $\text{H}_{11}$ ), 7.22-7.36 (2H, m,  $\text{H}_{12} + \text{H}_{13}$ ), 7.63-7.72 (2H, m,  $\text{H}_1 + \text{H}_3$ ), 7.99-8.03 (2H, m,  $\text{H}_6 + \text{H}_7$ ), 8.61-8.68 (2H, m,  $\text{H}_4 + \text{H}_9$ ).

Preparación del derivado de  $N^5, N^{10}$ -dióxido de 7(8)-bromofenazina-2-(4-metil-fenil)sulfonamida, 13.

**Síntesis por vía tradicional.** Bajo atmósfera de nitrógeno se añaden 0.33 mmol de  $N^5, N^{10}$ -dióxido de 7(8)-bromo-2-aminofenazina y 0.33 mmol de cloruro de *p*-toluensulfonylo en 1 mL de  $\text{CH}_3\text{CN}$  a temperatura ambiente. La mezcla se coloca en baño de hielo a  $-5^\circ\text{C}$ , para la adición de 3.3 mmoles de piridina. Luego se deja a temperatura ambiente por 5.5 h. Posteriormente, se realiza una extracción con acetato de etilo/ácido clorhídrico, obteniendo en la fase orgánica un producto que se purifica por CC ( $\text{SiO}_2$ , acetato de etilo:hexanos; 7:3) que se corresponde con el producto deseado.

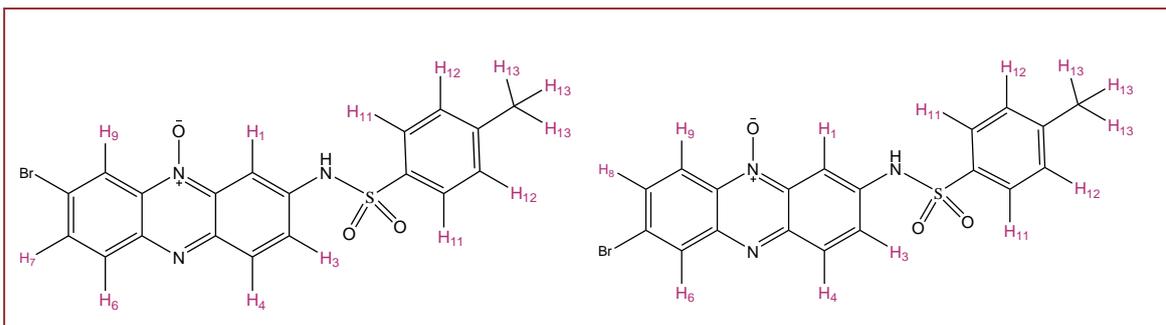
**Síntesis asistida por microondas.** Se añaden 0.16 mmol de  $N^5, N^{10}$ -dióxido de 7(8)-bromo-2-aminofenazina y 0.16 mmol de cloruro de *p*-toluensulfonilo en 3mL de  $CH_3CN$ , en un vial de microondas a temperatura ambiente. El microondas se programa a 120°C, 8atm, 700watts. El tiempo de reacción es 20 min. Para obtener el producto deseado el crudo se purifica por CC ( $SiO_2$ , acetato de etilo:hexanos; 7:3).



**$N^5, N^{10}$ -dióxido de 7(8)-bromofenazina-2-(4-metilfenil)sulfonamida, 13.** Proporción 7-isómero:8 isómero (5.2:4.8). Rendimiento síntesis por vía tradicional 5%. Rendimiento síntesis asistida por microondas 15%. Sólido naranja. MS, m/z (%): 461 ( $M^+$ , 5.16), 445 (1.35), 304 (100), 288 (32.26).  $^1HRMN$  7-isómero ( $DMSO-d_6:D_2O$  (1:1), 400MHz)  $\delta$ : 2.38 (3H, s,  $H_{13}$ ), 7.38-7.42 (3H, m,  $H_{12} + H_1$ ), 7.52-7.54 (1H, m,  $H_3$ ), 7.72-7.71 (1H, m,  $H_8$ ), 7.86 (2H, d,  $H_{11}$ ,  $J=8.4Hz$ ), 8.27-8.31 (3H, m,  $H_4 + H_6 + H_9$ ).  $^1H$  RMN 8-isómero ( $DMSO-d_6:D_2O$  (1:1), 400MHz)  $\delta$ : 2.35 (3H, s,  $H_{13}$ ), 7.38-7.42 (3H, m,  $H_{12} + H_3$ ), 7.52-7.54 (1H, m,  $H_1$ ), 7.86 (2H, d,  $H_{11}$ ,  $J=8.4Hz$ ), 7.91-7.94 (2H, m,  $H_4 + H_7$ ), 8.27-8.31 (1H, m,  $H_9$ ), 8.54 (1H, d,  $H_6$ ,  $J=2Hz$ ).  $^{13}C$  RMN: (ambos isómeros) (HSQC-HMBC) ( $DMSO-d_6:D_2O$  (1:1), 100MHz)  $\delta$ : 21.54, 128.96, 128.97, 129.02, 129.05, 129.07, 129.10, 129.15, 129.25, 129.93, 129.94, 129.96, 129.99, 131.00, 131.11, 131.15, 131.30, 131.40, 131.50.

**Preparación del derivado de  $N^5$ -óxido de 7(8)-bromo fenazina-2-(4-metilfenil) sulfonamida, 14.**

Se disuelven 0.087mmol del derivado de  $N^5, N^{10}$ -dióxido de 7(8)-bromo fenazina-2-(4-metilfenil) sulfonamida en una solución de ácido clorhídrico concentrado (0.06 mL) en metanol (2.7 mL), a temperatura ambiente. Se agregan 0.35mmol de ditionito de sodio. La reacción se agita a temperatura ambiente por 3 h, hasta verificar ausencia del reactivo. Se evapora el disolvente a vacío y se trata el residuo con una solución saturada de bicarbonato de sodio, se extrae con acetato de etilo y el disolvente se destila a vacío. El residuo es purificado por CC ( $SiO_2$ , acetato de etilo: hexano; 7:3).



**N<sup>5</sup>-dioxido de 7(8)-bromo fenazina-2-(4-metilfenil) sulfonamida, 14.** Proporción 7-isómero:8 isómero (5.6:4.4). Rendimiento 45%. Sólido amarillo-naranja. MS, m/z (%): 446 (M<sup>+</sup>, 100), 289 (32), 124 (8). <sup>1</sup>H RMN 7-isómero (DMSO-d<sub>6</sub>:D<sub>2</sub>O (1:1), 400MHz) δ: 2.34 (3H, s, H<sub>13</sub>), 7.36-7.39 (3H, m, H<sub>12</sub> + H<sub>1</sub>), 7.63-7.67 (1H, m, H<sub>3</sub>), 7.76-7.77 (1H, m, H<sub>8</sub>), 7.84-7.98 (5H, m, H<sub>11</sub> + H<sub>4</sub> + H<sub>6</sub> + H<sub>9</sub>). <sup>1</sup>H RMN 8-isómero (DMSO-d<sub>6</sub>:D<sub>2</sub>O (1:1), 400MHz) δ: 2.37 (3H, s, H<sub>13</sub>), 7.36-7.39 (3H, m, H<sub>12</sub> + H<sub>3</sub>), 7.63-7.67 (1H, m, H<sub>1</sub>), 7.84-7.98 (5H, m, H<sub>11</sub> + H<sub>4</sub> + H<sub>7</sub> + H<sub>9</sub>), 8.28 (1H, d, H<sub>6</sub>, J=2.4Hz). <sup>13</sup>C RMN: (ambos isómeros) (HMQC-HMBC) (DMSO-d<sub>6</sub>:D<sub>2</sub>O (1:1), 100MHz) δ: 22.55, 125.96, 127.48, 127.76, 128.50, 129.20, 129.55, 129.73, 129.91, 129.95, 130.37, 130.41, 131.27, 131.41, 131.46, 131.47, 133.84, 134.05, 134.34.

## 7.2 Estudio teórico de las propiedades esteroelectrónicas de los derivados de N,N'-dióxidos de fenazina

Los mapas de densidad electrónica mapeada sobre potencial electrostático y el cálculo de las cargas Mulliken sobre los átomos nucleófilos se realizan en el programa Spartan 4.0. Se realiza una búsqueda conformacional por mecánica molecular y optimización de geometría utilizando el método semiempírico AM1.

## 7.3 Ensayo de inhibición de la enzima topoisomerasa II en levaduras *Saccharomyces cerevisiae*

Cepas de levaduras: Se utilizan cuatro cepas de levaduras diferentes.

- SC7K(*lys2-3*) salvaje para el gen de la topoisomerasa II.
- ts14-16, *atop(2-1)(lys2 ade1 ade2 gal1 his7 ura1 tyr1)* mutante para este gen.
- JN362a (*ura3-52 leu2 trp1 his7 ade1-2 ISE2*)
- JN362at2-1 (*ura3-52 leu2 trp1 his7 ade1-2 ISE2 top2-1*)

Las cepas JN362a y JN362at2-1 son isogénicas, salvaje y mutante para el gen de la topoisomerasa II respectivamente. Todas las cepas de levaduras se conservan en tubos con agar inclinado a 4°C.

Medios de cultivo.

YPD: 1% extracto de levadura (US Biological, Cleveland, Ohio, USA), 2% bactopectona (US Biological, Cleveland, Ohio, USA) y 2% dextrosa (Sigma, St Louis, Illinois, USA).

YPD (medio sólido): medio YPD más 2% de agar (US Biological, Cleveland, Ohio, USA).

Preparación de las levaduras. Las cepas de levaduras se conservan en tubos con agar inclinado a 4°C. La preparación de las mismas para el ensayo consta de dos etapas: un primer pasaje (1p), y un segundo pasaje (2p). El primer pasaje se realiza tomando con un anza una muestra de levaduras presentes en el agar inclinado, y colocando esa muestra en un medio YPD. El primer pasaje puede utilizarse entre las 24 horas y los 7 días de preparado. El segundo pasaje se realiza a partir del primer pasaje. Previo a la realización del segundo pasaje se cuentan las células del primer pasaje en una cámara cuenta células de Neubauer. Una vez conocida la concentración de células del primer pasaje, se calcula el volumen de células que va a agregarse al segundo pasaje, para obtener la concentración celular necesaria para iniciar el tratamiento. Este cálculo se realiza mediante la ecuación **a** y **b** (figura 7.3.1). En la ecuación **a** se calcula  $N_0$  que es el número de células inicial/mL que se requiere en el segundo pasaje, a partir de diferentes parámetros.  $N$  es la concentración de células/mL que se requiere para iniciar el tratamiento, es entre  $5 \times 10^6$  y  $1 \times 10^7$ , ya que en ese rango las células se encuentran en fase exponencial. Los parámetros  $t/TGC$  hacen referencia al número de ciclos de división que van a completar las células en un tiempo determinado, este tiempo es arbitrario y es el tiempo ( $t$ ) entre la realización del segundo pasaje y la realización del tratamiento,  $TGC$  es el tiempo de generación celular.

$$\mathbf{a-} \quad N = N_0 \times 2^{t/TGC}$$

$$\mathbf{b-} \quad [\text{células/mL}]_{1p} \times V_1 = N_0 \times V_2$$

Figura 7.3.1-Ecuaciones para el cálculo de la concentración celular necesaria para iniciar el tratamiento.

**a-** Cálculo de  $N_0$ , para conocer la concentración inicial que se requiere en el segundo pasaje. **b-** Cálculo para conocer el volumen que se agrega al segundo pasaje desde el primer pasaje.  $[\text{células/mL}]_{1p}$  es la concentración celular del primer pasaje,  $V_1$  es el volumen a tomar del primer pasaje para colocar en el segundo pasaje,  $V_2$  es el volumen de YPD del segundo pasaje.

Una vez realizado el 2p y esperado el tiempo calculado, se cuentan las células en la cámara de Neubauer, si la concentración del 2p se encuentra entre  $5 \times 10^6$  -  $1 \times 10^7$  células/mL se comienza el tratamiento.

Preparación de los productos. El compuesto 1 para la puesta a punto se disuelve en PEG 6000. Posteriormente los productos se disuelven en DMSO (dimetilsulfóxido), a excepción del fármaco etopósido que se encuentra en su preparación farmacéutica cuya concentración es 100mg/5mL. Al preparar las soluciones en DMSO, se considera que el volumen final que se permite agregar de esta solución al tratamiento es 0.1mL, ya que se trabaja con un porcentaje de DMSO de 5%.

Tratamiento. En tubos estériles de 10mL se colocan 1.5mL de células del 2p, 400μL de agua destilada y 100μL de la solución del producto a ensayar. Para compuestos que se utilizan a concentración 1mM, la solución madre en DMSO es de 20mM; y para compuestos que se utilizan a concentración 0.1mM, la solución madre en DMSO es de 2mM. En el ensayo siempre se realiza un control con células sin tratamiento, el cual contiene 1.5mL de células del 2p, 400μL de agua destilada y 100μL de DMSO.

Las células se incuban por 60min a diferentes temperaturas, las mismas se muestran en la *tabla 7.3.1.*

Cepa de levadura	Temperatura de incubación
SC7K( <i>lys2-3</i> )	30°C
ts14-16	22°C
JN362a	30°C
JN362at2-1	30°C

Tabla 7.3.1-Temperatura de incubación de las diferentes cepas de levaduras en el tratamiento.

Posteriormente se realizan dos lavados con agua destilada. Se descarta el sobrenadante y se resuspende el pellet en agua destilada. En cada lavado se centrifuga a 5000rpm por 4min. Finalmente se realizan diluciones 1/10000 para el control y 1/1000 para las muestras tratadas. De las muestras diluidas se toman 200 μL y se siembran en placa de petri las cuales contienen medio YPDA. Se siembran tres placas por muestra. Las muestras se realizan por duplicado.

Tratamiento de datos. Las células que crecen en las placas de petri se cuentan a los 3 días de realizado el tratamiento. A veces como las células mutantes de esta enzima presentan un crecimiento más lento que las células salvajes, se recuentan a los 6 días de realizado el tratamiento. El porcentaje de sobrevivencia se calcula como el cociente entre las células que crecieron bajo tratamiento sobre las células que crecieron en el control x 100. El análisis estadístico se realiza con el método de distribución binomial, con un intervalo de confianza de 95%.

Curvas de crecimiento. A las cuatro cepas de levaduras se les realiza un primer pasaje tomando con un anza una muestra de las mismas, las cuales se encuentran en tubos de agar inclinado, y colocando las muestras en medios YPD independientes. Para realizar las curvas de crecimiento se toman muestras por duplicado a los tiempos 0, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12 y 14 horas de realizado el primer pasaje. Las células se fijan en formol al 10% para su posterior recuento. El análisis de los resultados se realiza según el método de desvío estándar.

#### **7.5-Evaluación de la capacidad de interacción con ADN<sup>7,8</sup>**

Se prepara una solución madre de ADN 2,5mg/mL, disolviendo 12,5mg de ADN puro de timo de ternera (Sigma Chemical Co., USA) en 5,0mL de buffer fosfato (50mM; pH 6,0). La solución se mantiene en agitación a 4°C durante 16 h. A partir de esta solución se hacen las correspondientes diluciones. Las medidas de fluorescencia se registran en un espectrofotómetro Varioskan Flash 2.4.1.

Para los estudios de *quenching* el compuesto se disuelve en DMSO y su concentración se mantiene constante (20µM), la concentración de DMSO en el posillo es de 20%. La concentración de ADN varía en un rango de 0 a 400µM, se mantiene constante el volumen de la solución completando con buffer hasta un volumen final de 200µL.

Se incuba el compuesto con el ADN a 37°C durante 30 min y luego se procede a realizar las medidas. Los espectros de emisión se registran entre 320 nm y 840 nm, excitando a la longitud de onda de absorción máxima, con un ancho de banda de 12nm. Todas las lecturas se realizan por triplicado.

#### 7.4- Ensayo *in vitro* de bio-reducción en condiciones de normoxia/hipoxia<sup>9</sup>

El producto se disuelve en DMSO (40  $\mu$ M) y se incuba durante 30 minutos a 37°C, en buffer fosfato (0.1M, 1.5 mM EDTA, pH 7.4) con fracciones microsomales, citosólicas o S9 obtenidas del homogeneizado de hígado de ratas Wistar de 3 semanas de 200g de peso corporal (1mg/mL) y un sistema generador de NADPH (1.3 mM MgCl<sub>2</sub>, 40  $\mu$ M NADP<sup>+</sup>, 3.5 mM glucosa-6-fosfato, 0.5U/mL glucosa-6-fosfato deshidrogenasa). La bio-reducción en condiciones de hipoxia simulada se realizó gaseando con nitrógeno previamente la mezcla de reacción durante 20 min.

La reacción se detiene agregando 400  $\mu$ L de metanol. Los productos se aíslan realizando tres extracciones con 400  $\mu$ L de acetato de etilo. El disolvente orgánico se destila a vacío y se resuspende en un volumen mínimo de acetato de etilo.

Los productos se identifican por cromatografía en capa fina (CCF). Se realiza una CCF (SiO<sub>2</sub>, acetato de etilo:hexano 1:1), en ella se siembra toda la reacción resuspendida en un volumen mínimo de acetato de etilo. Se comparan los productos obtenidos con patrones de posibles productos resultantes de la bio-reducción previamente sintetizados. Las CCF se revelan con luz UV o anisaldehído.

#### **Bibliografía**

- 1- Lavaggi, M.L. Dióxidos de Fenazina como Agentes Citotóxicos Selectivos en Hipoxia. Trabajo Especial II de Licenciatura en Bioquímica. Facultad de Ciencias. UdelaR. 2004.
- 2- Porcal, W; Hernández, P; Boiani, L; Boiani, M; Ferreira, A; Chidichimo, A; Cazzulo, J.J.; Olea-Azar, C; González, M; Cerecetto, H. New trypanocidal hybrid compounds from the association of hydrazone moieties and benzofuroxan heterocycle. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. 16 (14), 6995-7004, 2008.
- 3- Torre, M.H.; Gambino, D; Araujo, J; Cerecetto, H; González, M; Lavaggi, M.L.; Azqueta, A; López de Cerain, A; Monge Vega, A; Abram, U; Costa-Filho, A. Novel Cu(II) Quinoxaline N,N'-dioxide complexes as selective hypoxic cytotoxins. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 40 (5), 473-480, 2005.
- 4- Ludwig, G.-W.; Baumgartel, H, Isomerengildung bei der benzofurazan N-oxide mit fenolaten. *Chemical Bericht*. 115, 2380-2382, 1982.

- 5- Cerecetto, H; González, M; Lavaggi, M.L.; Azqueta, A; Ezpeleta, O; López de Cerain, A; Monge-Vega, A. Phenazine 5,10-Dioxide Derivatives as Hypoxic Selective Cytotoxins. *Journal of Medicinal Chemistry*. 48 (1), 21-23, 2005.
- 6- Lavaggi, M.L. “Hipoxia como diana terapéutica para el tratamiento de tumores sólidos: desarrollo de profármacos selectivos de N-N’ dióxido de fenazina”. Tesis de Doctorado en Química. Facultad de Química. UdelaR. 2009.
- 7- Nieves, M. “Derivados N-N’ dióxido de fenazina como agentes bio-reducibles en hipoxia que interaccionan con el ADN”. Tesis de Licenciatura en Bioquímica. Facultad de Ciencias. UdelaR. 2012.
- 8- Lavaggi, ML; Nieves, M; Cabrera, M; Olea-Azar, C; López de Ceráin, A; Monge, A; Cerecetto, H; González, M. Structural modifications on the phenazine N,N'-dioxide-scaffold looking for new selective hypoxic cytotoxins. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 45 (11), 5362-5369, 2010.
- 9- Lavaggi, M.L.; Cabrera, M; Cerecetto, H; González, M. Differential enzymatic reductions governing the differential hypoxia-selective cytotoxicities of phenazine 5,10-dioxides. *Chemical Research in Toxicology*. 21 (9), 1900-1906, 2008.