

Desarrollo de profármacos selectivos en hipoxia para el tratamiento de tumores sólidos derivados de N^5, N^{10} -dióxido de fenazinas

Agustina Berchesi

Tutor: Dra. María Laura Lavaggi

Co-tutor: Dra. Beatriz Garat

**Tesina de grado Licenciatura en Bioquímica
Facultad de Ciencias – Universidad de la República
Montevideo, Julio 2013**



“The one who follows the crowd
will usually go no further than the crowd.

Those who walk alone are likely to find
themselves in places no one has ever been before”.

Albert Einstein

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer a todos aquellos que me acompañaron en este proceso, y a todos los que de alguna manera u otra me ayudaron a lograrlo:

A Hugo y Mercedes por abrirme las puertas del laboratorio, por su experiencia y su confianza en mí.

A María Laura por su confianza, su paciencia, por su constante dedicación y preocupación. Por siempre animarme a seguir adelante, alentándome a lograr innumerables cosas.

A Beatriz por su confianza, por las explicativas, por su ayuda y ante todo su mentalidad positiva.

A Lorena por toda su ayuda, su paciencia, su dedicación y sobre todo por su buen humor.

A mis padres por su apoyo incondicional, por guiarme en la vida y dejarme ser, pero básicamente por todo.

A mis hermanos Sebastián y Gabriel por enseñarme mucho más de lo que creen, con sus reflexiones y con su ejemplo.

A todos mis compañeros del laboratorio, por el día a día, el trabajo, el compartir los conocimientos, los almuerzos, las salidas y sobre todo la buena onda.

A Marcos Nieves por permitirme trabajar con sus productos.

A todos los integrantes del laboratorio de interacciones moleculares, gracias por su colaboración y buena onda en el tiempo que estuve trabajando ahí.

A mis amigos y amigas de la carrera con quienes compartimos mucho estudio y diversión. En especial a Martín con quien compartí toda la carrera, siempre tirándome para adelante, exigiendo y valorando lo mejor de mí.

A mis amigas y amigos de la vida por todos los momentos vividos juntos y por su aguante en el día a día.

A ANII y CSIC por el apoyo económico.

ÍNDICE

RESUMEN	VII
ABREVIATURAS.....	VIII
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Aspectos generales del cáncer	1
1.2 Hipoxia tumoral.....	4
1.3 Profármacos selectivos en hipoxia	6
1.4 Agentes intercalantes de ADN	9
1.5 Bibliografía	11
2. ANTECEDENTES Y DISEÑO DE NUEVOS COMPUESTOS	15
2.1 Diseño racional de nuevos derivados de N^5N^{10} -dióxido de fenazina	15
2.2 Bibliografía	19
3. OBJETIVOS	22
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	23
4.1 Síntesis química.....	23
4.1.1 Síntesis de los derivados de N -óxido de benzo [1,2-c]1,2,5-oxadiazol	23
4.1.2 Síntesis del heterociclo N^5,N^{10} -dióxido de fenazina	24
4.1.3 Síntesis y caracterización fisicoquímica de N^5,N^{10} -dióxido de 2-ftamidilpropiloxifenazina	25
4.1.4 Síntesis y caracterización fisicoquímica de N^5,N^{10} -dióxido de 2-hidroxi-propiloxifenazina (6) y N^5,N^{10} -dióxido de 7(8)-bromo-2-hidroxi-propiloxifenazina (7)	29
4.1.5 Desprotección N^5,N^{10} -dióxido de 2-ftalimidilpropiloxifenazina (5).....	39
4.1.6 Bibliografía	40
4.2 Evaluación biológica	41
4.2.1 Estudio de interacción DNA- compuesto por espectroscopia de fluorescencia	41
4.2.2 Estudio de interacción DNA- compuesto por electroforesis.....	44

4.2.3 Bibliografía	56
5. CONCLUSIONES	57
6. PERSPECTIVAS	58
7. MÉTODOS EXPERIMENTALES	59
7.1 Síntesis y caracterización química.....	59
7.1.1 Preparación de derivados de 1-óxido de benzo[1,2-c]1,2,5-oxadiazol (a-c).....	60
7.1.2 Preparación de derivados de N^5, N^{10} -dióxido de 2-aminofenazina (2)	60
7.1.3 Preparación de derivados de N^5, N^{10} -dióxido de 2-hidroxifenazina (1, 3, 4)	60
7.1.4 Síntesis de N^5, N^{10} -dióxido de 2-ftalimidilpropiloxifenazina (5).....	61
7.1.5 Síntesis de N^5, N^{10} -dióxido de 2-hidroxi-propiloxifenazina (6)	62
7.1.6 Síntesis de N^5, N^{10} -dióxido de 7(8)-bromo-2-hidroxi-propiloxifenazina (7)	63
7.2 Evaluación biológica	64
7.2.1 Evaluación de la capacidad de interacción con ADN mediante espectroscopía de fluorescencia	64
7.2.2 Evaluación de la capacidad de interacción con ADN mediante electroforesis	64
7.3 Bibliografía	67

RESUMEN

El cáncer es una enfermedad multifactorial que determina millones de muertes anuales a nivel mundial. En Uruguay es el responsable del 25% de las muertes. A pesar de que el cáncer ha sido estudiado por años desde diferentes aspectos tanto biológicos como bioquímicos, aún no se ha descubierto un tratamiento eficaz y seguro para el mismo.

Los tumores sólidos se caracterizan por la formación de una masa celular que tiene características biológicas únicas como resultado de la insuficiente neovascularización.

El sistema vascular inadecuado en los tumores sólidos lleva al desarrollo de poblaciones celulares distantes de los vasos sanguíneos y como consecuencia son hipóxicas. A pesar de que la hipoxia tumoral es un problema al conferir resistencia a las terapias antitumorales actuales, en las circunstancias apropiadas puede ser visto como una ventaja. Esto llevó al desarrollo de un grupo especial de agentes citotóxicos conocidos como citotoxinas selectivas en hipoxia.

Las citotoxinas selectivas en hipoxia, también conocidas como profármacos bio-reducibles, son compuestos inactivos *per se* que se reducen química o enzimáticamente *in vivo* a un intermedio, fármaco, siendo este proceso reversible en presencia de oxígeno. Así el confinamiento de la hipoxia en el tumor sólido y el desarrollo de citotoxinas sensibles al oxígeno hacen que la hipoxia tumoral pase de ser un problema potencial para el tratamiento del cáncer a ser una ventaja para la terapia.

En el presente trabajo se buscó determinar si las cadenas laterales de una familia de derivados de fenoxi y feniletanilfenazina generaban interacción con ADN. Para completar el estudio de relación estructura-actividad se decidió ampliar la familia de compuestos de derivados de N^5, N^{10} -dióxido de fenazinas como agentes bio-reducibles en hipoxia capaces de interactuar con el ADN. Los nuevos compuestos fueron sintetizados de tal manera de que las modificaciones pudieran dar información sobre la influencia de la sustitución del grupo hidroxilo de la fenazina con cadenas hidroxialquílicas.

De los derivados ensayados, la mayoría evidenciaron una interacción con el ADN. Se observó una actividad de corte de hebras que fue diferencialmente potenciada por todos los sustituyentes, a excepción del sustituyente ftalimidilpropil. Dentro de los sustituyentes, el 4-aminoguanidonilfenoxi, fue el que causó una mayor degradación del ADN.

ABREVIATURAS

18-C-6 - Éter corona	Tris - Tris(hidroximetil)aminometano
ACN - Acetonitrilo	THF - Tetrahidrofurano
AcOEt - Acetato de etilo	T amb - Temperatura ambiente
ADN - Ácido Desoxirribonucleico	
Atm - Atmósfera	
CC - Cromatografía en columna	
CCF - Cromatografía en capa fina	
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_3\text{NI}$ - Ioduro de tetrabutilamonio	
CH_3NH_2 - Metilamina	
COSY - Espectroscopía de correlación	
DCM- Dicloro metano	
DMF - Dimetilformamida	
DMSO - Dimetilsulfóxido	
EDTA - Ácido etilendiaminotetracético	
EP - Éter de petróleo	
EtOH - Etanol	
$\text{H}_2\text{NH}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ - Hidracina	
^1H -RMN - Resonancia magnética de protón	
HBr - Ácido bromhídrico	
HCl - Ácido clorhídrico	
HIF-1 α - Del inglés, hypoxia inducible factor	
HMBC - Experimento bidimensional de correlación heteronuclear a distancia	
HSQC- Experimento bidimensional de correlación heteronuclear a un enlace	
K_2CO_3 - Carbonato de potasio	
KI - Ioduro de potasio	
MeOH - Metanol	
MeONa - Metóxido de sodio	
NaClO - Hipoclorito de sodio	
NaOH - Hidróxido de sodio	
OMS - Organización Mundial de la Salud	
$\text{S}_{\text{N}}2$ - Sustitución nucleofílica	

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Aspectos generales del cáncer

El **cáncer** es una de las principales causas de muerte en todo el mundo, aproximadamente un tercio de la población desarrolla esta enfermedad durante su vida. Cáncer es un término genérico que designa un amplio grupo de enfermedades que tienen la potencialidad de afectar a cualquier parte del organismo.¹ Ya se han descrito más de 200 variedades de cáncer que afectan diferentes órganos y tejidos y requieren tratamientos muy variados. La incidencia en los diferentes tipos de cáncer varía mucho entre diferentes países. Estas diferencias no son de carácter hereditario sino más bien ambiental.²

A pesar de que se han descrito cambios epigenéticos que modifican la expresión génica causando cancer³, la conexión entre el cáncer y los factores ambientales sugiere que la mayoría de los cánceres son originados por agentes que producen cambios en la información genética de una célula. Las células normales actúan en conjunto para controlar su crecimiento y otras propiedades en balance con todo el organismo. Éstas son estrictamente reguladas por una variedad de procesos². Las **mutaciones genéticas** causan que algunas células evadan el estricto control del desarrollo celular y comiencen a propagarse a expensas de las células vecinas, comprometiendo el crecimiento, la división de las células normales y la supervivencia del organismo. Los genes cuya mutación puede dar lugar al cáncer se clasifican en oncogenes y genes supresores de tumores. Los primeros corresponden a aquellos en los que la mutación tiene un efecto dominante, mientras que los genes supresores de tumores deben sufrir una mutación en ambos cromosomas para dar lugar a la transformación maligna⁴.

La mutación en el ADN debe ocurrir en un lugar que no desencadene la muerte celular, que genere un cambio de comportamiento y que conduzca a una adaptación que le permita a la célula tumoral competir con ventaja frente al resto de las células del organismo². Estas mutaciones genéticas causan una pérdida en la fidelidad de replicación, reparación y segregación de los cromosomas durante el ciclo celular⁵. Cuando esto sucede, las células no mueren y células nuevas se forman cuando el cuerpo no las necesita. Como se muestra en la figura 1.1, esta proliferación celular descontrolada de células mutantes puede resultar en la formación de una masa celular conocida como tumor o tumor sólido⁶.

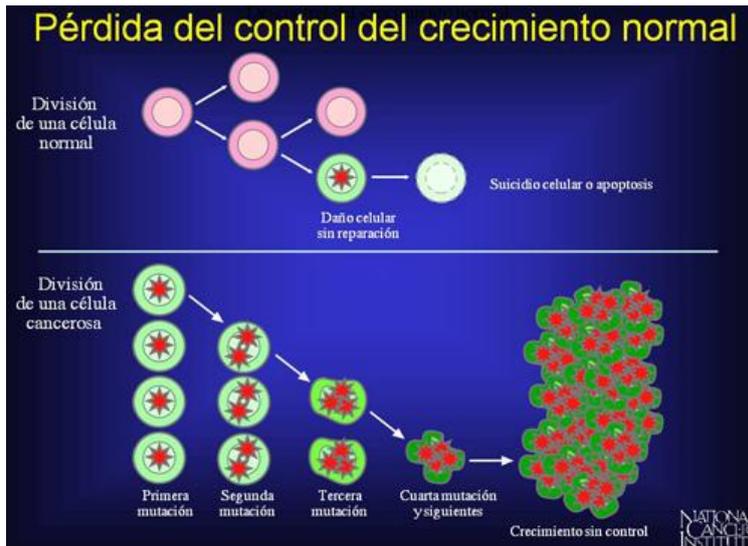


Figura 1.1- Pérdida del control del crecimiento celular normal. Extraído de⁷.

No todos los tumores causan cáncer y pueden clasificarse según su origen y naturaleza. Si las células tumorales permanecen agrupadas en una masa única se dice que el tumor es benigno. Las células al estar confinadas no se diseminan a otras partes del cuerpo y generalmente se puede conseguir la curación completa extrayendo la masa tumoral mediante cirugía. Por el contrario si las células tumorales pueden invadir tejidos cercanos y diseminarse a otras partes del cuerpo, el tumor se considera maligno y éste es capaz de dar origen a la enfermedad del cáncer. La capacidad invasora implica, generalmente, la habilidad de liberarse, entrar en el torrente sanguíneo o en los vasos linfáticos y formar tumores secundarios o metástasis en lugares diferentes al del tumor primario⁸. En nuestro organismo existen distintos tipos de células y a pesar de que cualquiera de ellas puede potencialmente originar un tumor, el 90% de los tumores son generados por células epiteliales, denominándose carcinomas. Los otros tipos mayoritarios de cánceres son los sarcomas, derivados de células de tejidos conectivo o muscular, las leucemias, linfomas y mielomas, originados por células de la sangre y los neuroblastomas y gliomas, que derivan de células del sistema nervioso⁹.

Epidemiología

En el año 2008, cerca de 12.7 millones de nuevos casos y 7.6 millones de muertes se produjeron por cáncer mundialmente¹⁰.

En Uruguay, los tumores malignos constituyen la segunda causa de muerte detrás de las enfermedades cardiovasculares, dando cuenta actualmente de más del 24 % de todas las defunciones anuales¹¹.

Como se muestra en la figura 1.2 los tipos de cánceres más frecuentes y de mayor mortandad, en hombres y mujeres uruguayos entre los años 2004 y 2008 y según el Registro Nacional de Cáncer, son el cáncer de pulmón y próstata en el hombre y el cáncer de mama en la mujer¹¹.

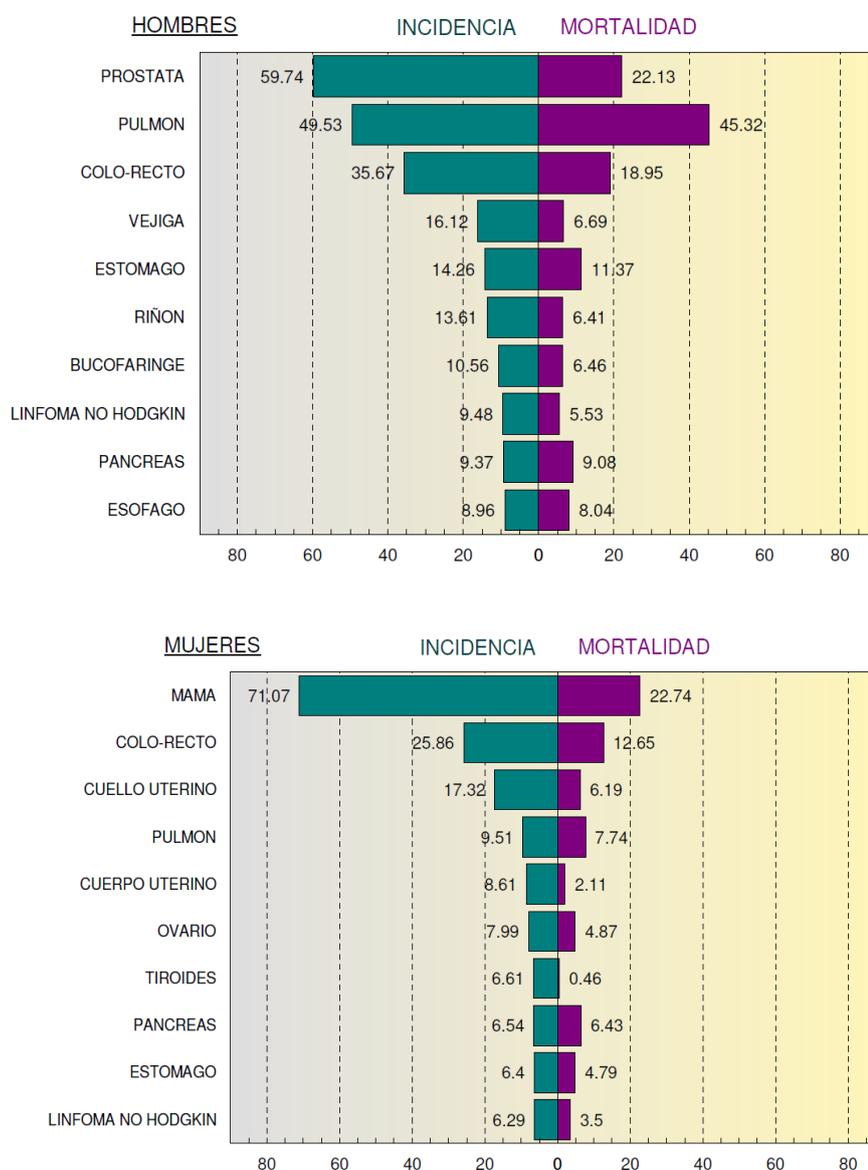


Figura 1.2- Incidencia del cáncer en hombres y mujeres uruguayos entre 2004 y 2008. Se expresa la tasa (tasa ajustada por edad a la población mundial estándar expresada en casos x 100000) de incidencia ajustada a la población¹¹.

A pesar de haber sido estudiado por años, todavía no se ha descubierto un tratamiento eficaz y seguro para el mismo. Los tratamientos actuales incluyen la remoción quirúrgica de tumores, la radioterapia y la quimioterapia, pero cuando aparecen múltiples metástasis, estas aproximaciones terapéuticas se vuelven inefectivas¹². Entre los agentes quimioterápicos para el tratamiento de tumores sólidos, se reconoce la ciclofosfamida, el paclitaxel y el cisplatino, pero estos presentan un grado de selectividad por las células tumorales muy reducido¹³. Las diferencias tan sutiles entre una célula tumoral y una normal hacen que la erradicación selectiva de las células tumorales sea una tarea muy complicada y resultan en un desafío importante para la búsqueda de nuevos agentes quimioterápicos.

1.2 Hipoxia tumoral

Los tumores sólidos forman más del 90% de los cánceres presentes en humanos. Cuando el tumor comienza a diseminarse, éste debe establecer su propio suministro de sangre a través de la estimulación del crecimiento de células de los vasos sanguíneos que rodean al tumor. Este proceso es conocido como angiogénesis¹⁴. Los nuevos vasos sanguíneos formados en el tumor tienen características muy diferentes a los de la vasculatura normal. Mientras que los tejidos normales tienen vasos sanguíneos uniformes y lo suficientemente cerca unos de otros para poder oxigenar todo el tejido, los vasos sanguíneos de un tumor son altamente irregulares y tortuosos, con derivaciones arteriovenosas, con ausencia de musculo liso y con revestimiento endotelial incompleto¹⁵.

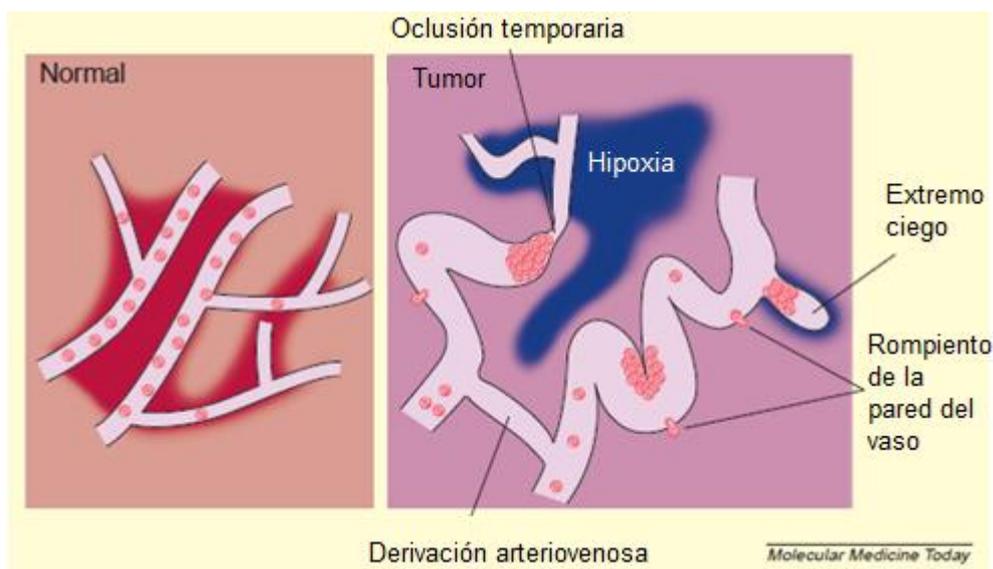


Figura 1.3 – Ilustración de las principales diferencias entre una vasculatura normal y un tejido maligno. Modificado de Molecular Medicine Today¹⁴.

Como resultado, el flujo sanguíneo es muy lento y altamente irregular, y por lo tanto, el abastecimiento de oxígeno y nutrientes será menos eficiente en células tumorales. Esto lleva a bajos niveles de oxígeno en la mayoría de los tumores, con áreas extremadamente hipóxicas. En proliferación, las células tumorales se encuentran más alejadas de los vasos sanguíneos que la distancia normal de difusión de oxígeno (alrededor de $100\mu\text{m}$)¹⁶ rindiendo células hipóxicas. El rango de tensiones de oxígeno en los

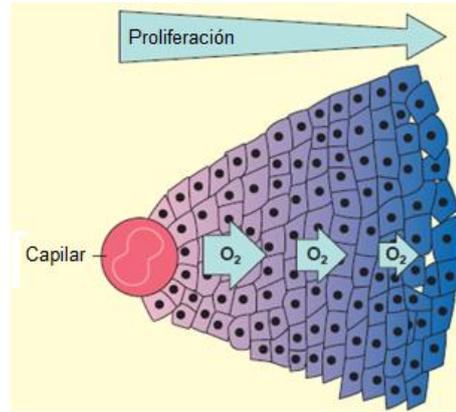


Figura 1.4 – Imagen del crecimiento de un tumor rodeando un capilar. Modificada de¹⁷

tumores sólidos está entre 10 y 30 mmHg, mientras que, en los tejidos normales es de 24 a 66 mmHg¹⁶. En estas regiones hipóxicas las células presentan una serie de adaptaciones metabólicas que les permiten sobrevivir. Por un lado, son capaces de inhibir la vía de p53 que estimula la muerte celular en respuesta a la hipoxia¹⁸. También son capaces de sobreexpresar los genes involucrados en el transporte de glucosa y la glucólisis¹⁹. Debido a la ausencia de oxígeno, las células recurren a la glucólisis y la fermentación anaeróbica como la principal fuente de energía, dando lugar a grandes concentraciones de lactato y a un marcado descenso en el pH intra y extracelular²⁰. Los bajos niveles de oxígeno también inducen alteraciones en el perfil de expresión génica. El factor de transcripción inducible por hipoxia HIF-1 es una proteína heterodimérica cuyas subunidades se denominan HIF-1 α y HIF-1 β . Mientras que HIF-1 β se expresa constitutivamente y se encuentra en el citosol a concentraciones relativamente estables, la concentración de HIF-1 α es regulada por la presencia de oxígeno. En condiciones de normoxia un residuo de prolina conservado en la subunidad α es hidroxilado, lo cual conduce a la ubiquitinación de la proteína y su degradación en el proteosoma. Cuando las concentraciones de oxígeno son bajas, hay un marcado descenso en el grado de hidroxilación y HIF-1 α alcanza altas concentraciones¹⁹. Se han descrito más de 40 genes inducidos por HIF-1 en condiciones de hipoxia. Entre estos encontramos enzimas involucradas en la glucólisis, factores de crecimiento y supervivencia celular, moléculas angiogénicas y enzimas involucradas en la metástasis e invasión de otros tejidos²¹.

Las células hipóxicas son más resistentes a las terapias convencionales de tratamiento del cáncer. Ya desde 1930²² se conoce que las condiciones hipóxicas de una célula la protegen frente a las radiaciones ionizantes. Las células normales son más sensibles a la radiación ya que las moléculas de oxígeno reaccionan rápidamente con los radicales libres producidos por la ionización de la radiación en el ADN, haciendo permanente el daño que causa la muerte

celular. En ausencia de oxígeno, el radical formado en el ADN es atrapado por dadores de hidrógeno presentes en la célula que reparan la lesión. A su vez la falta de vascularización y proliferación celular le confiere a los tumores resistencia frente a los agentes quimioterápicos que tienen como blanco a células en proliferación²³.

La hipoxia tumoral es un problema al conferir resistencia a las terapias antitumorales actuales pero al estar restringida a los tumores sólidos, puede ser utilizada para desarrollar nuevos fármacos antitumorales que sean selectivos en condiciones hipóxicas¹⁶. Las citotoxinas selectivas en hipoxia, también conocidas como profármacos bio reducibles, son compuestos inactivos que son capaces de ser reducidos química o enzimáticamente en condiciones hipóxicas para producir fármacos que causen citotoxicidad en células cancerígenas. La selectividad hacia las células tumorales se da debido a que el oxígeno molecular revierte el proceso de bio reducción en tejidos que están oxigenados^{24,25}.

1.3 Profármacos selectivos en hipoxia

Las consideraciones mencionadas anteriormente sugieren que la hipoxia tumoral debe ser considerada como un importante blanco terapéutico. Representa una importante diferencia entre células tumorales y células normales, y por lo tanto se pueden diseñar fármacos selectivamente tóxicos.

Es por esto, que hace tiempo se ha comenzado a explotar esta característica única de los tumores sólidos como una diana terapéutica que permite diseñar profármacos con citotoxicidad selectiva en hipoxia.¹⁴

En función de su estructura química, los profármacos bio-reducibles y moléculas en desarrollo pueden clasificarse en cuatro grandes grupos: derivados de quinonas, compuestos nitroaromáticos y compuestos que presentan grupos *N*-óxido de aminas alifáticas o aromáticas²⁶.

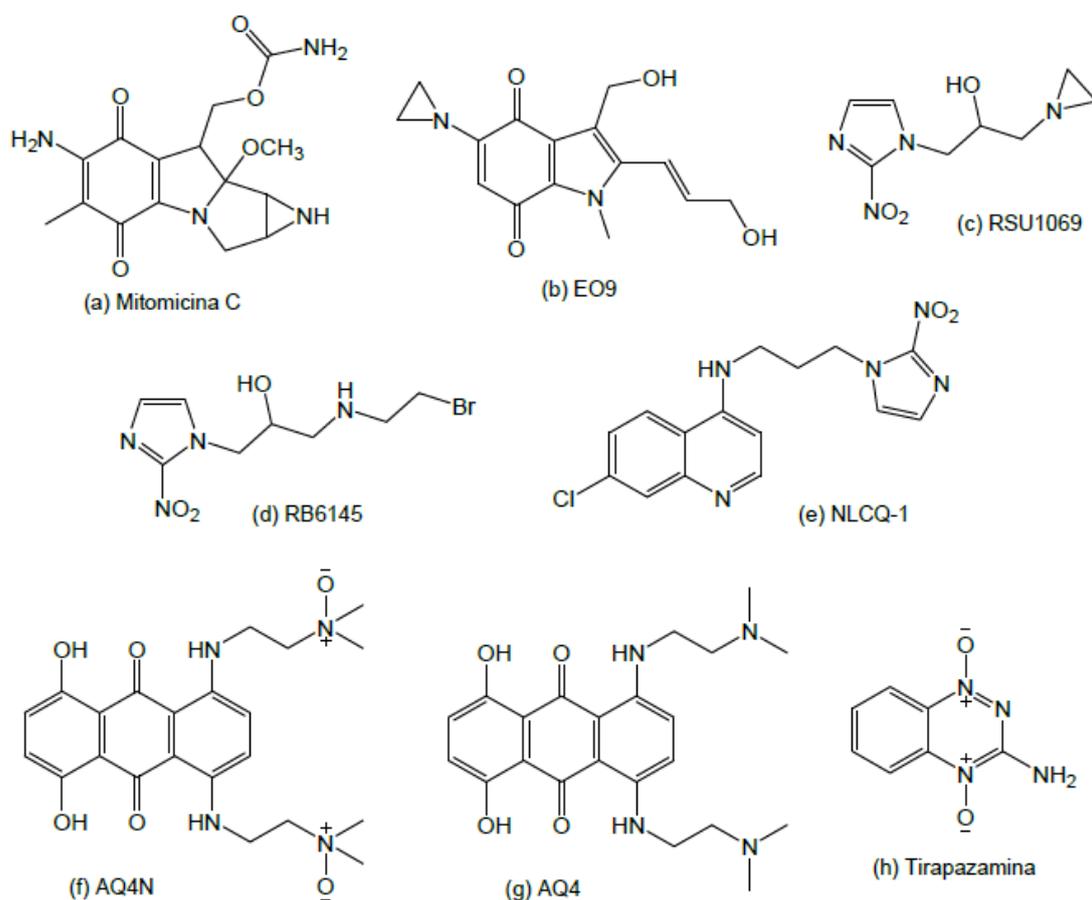


Figura 1.5 – Moléculas líderes de las diferentes familias de los compuestos bio-reducibles Extraído de²⁶.

La mitomicina C (figura 1.5a), introducido para su uso clínico en 1958, es el prototipo de un profármaco bio-reducible. Este fármaco ha mostrado cierta efectividad frente a diferentes tumores en combinación con otros agentes quimioterápicos y radiaciones ionizantes¹⁴. Sin embargo su grado de selectividad es bajo, ya que presenta una citotoxicidad *in vivo* sólo dos veces mayor en células hipóxicas que en células normalmente oxigenadas.

La principal enzima involucrada en su bio-reducción es citocromo P450. Ésta reduce al compuesto a través de un mecanismo que involucra el intercambio de un electrón y resulta reversible en presencia de oxígeno²⁷. El radical semi-quinona que se genera en ausencia de oxígeno, reacciona con la molécula de ADN estableciendo entrecruzamientos que resultan en la muerte celular. La mitomicina C también puede ser reducida por otras enzimas, como la DT-

diaforasa, en un mecanismo de reducción alternativo, vía dos electrones²⁸. Este fenómeno es el responsable de su reducida selectividad, ya que dicha activación no es reversible en presencia de oxígeno, contribuyendo a la citotoxicidad del fármaco sobre células normalmente oxigenadas. La reducida especificidad de la mitomicina C por los tejidos hipóxicos estimuló la búsqueda de nuevos derivados de quinona que mejoren el perfil de selectividad. Entre los más promisorios se encuentra la aziridinilindoloquinona EO9 (figura 1.5b), que presentó una selectividad en hipoxia mucho mayor²⁶.

Entre los compuestos **nitroaromáticos**, los más estudiados han sido el misonidazol y el metronidazol. Inicialmente desarrollados como radiosensibilizadores para quimioterapia, ambos mostraron citotoxicidad selectiva hacia células hipóxicas. Su mecanismo de bio-reducción implica varios pasos, en cada uno de los cuales la molécula gana electrones por acción de diferentes enzimas. El primer paso es reversible en presencia de oxígeno, mientras el resto no lo es²⁶. Debido a que la selectividad de ambos fármacos es moderada, se desarrollaron derivados con un mejor perfil de selectividad en hipoxia. Entre ellos se pueden destacar RSU1069 (figura 1.5c) y RB6145 (figura 1.5d). A pesar de presentar una mayor especificidad, ambos resultaron tóxicos a nivel gastrointestinal y de la retina respectivamente²⁶. También se han desarrollado derivados nitroaromáticos bio-reducibles con la capacidad de intercalarse en el ADN, como por ejemplo el derivado de quinoleína NLCQ-1 (figura 1.5e). Este compuesto resulta aproximadamente 40 veces más citotóxico en hipoxia que en normoxia, y es sustrato de las enzimas citocromo P450 y citocromo b5²⁹.

Dentro del grupo moléculas que presentan grupos **N-óxido** se encuentra el compuesto AQ4N (figura 1.5f), que presenta un grupo **N-óxido en una amina alifática**. Su derivado reducido AQ4 (figura 1.1g), es un análogo de la mitoxantrona, un potente agente intercalante. Mientras que AQ4N presenta escasa afinidad por ADN, AQ4 se une fuertemente a la doble hebra mediante intercalación. Además, AQ4 también pertenece a una nueva familia de potenciales agentes antitumorales, los inhibidores de topoisomerasa II³⁰. A diferencia de otros agentes bio-reducibles, AQ4N tiene la ventaja que su producto de reducción se mantiene activo a pesar de que la hipoxia que llevo a la bioactivación sea transitoria³¹. Dentro de las moléculas con un agrupamiento **N-óxido en una amina aromática** la molécula más estudiada es la tirapazamina³² (figura 1.1h). El grupo N-óxido adyacente al grupo amino de la molécula puede ser reducido vía un electrón por acción de enzimas reductasas, como citocromo P450 y óxido nítrico sintasa (NOS)³³. En ausencia de oxígeno, la entidad generada sufre un rearrreglo que,

con la pérdida de agua, genera un radical capaz de producir roturas en una o ambas hebras de la molécula de ADN³⁴. La tirapazamina ha mostrado una citotoxicidad marcadamente selectiva hacia células en condiciones de hipoxia. Por otro lado, a diferencia de otros compuestos bio-reducibles que requieren niveles muy bajos de oxígeno para su activación, la tirapazamina puede bio-reducirse en condiciones de hipoxia moderada. Esto la hace muy útil en terapias dirigidas hacia células en condiciones de oxigenación intermedia y en su combinación con otros fármacos con un rango de acción más limitado³⁵.

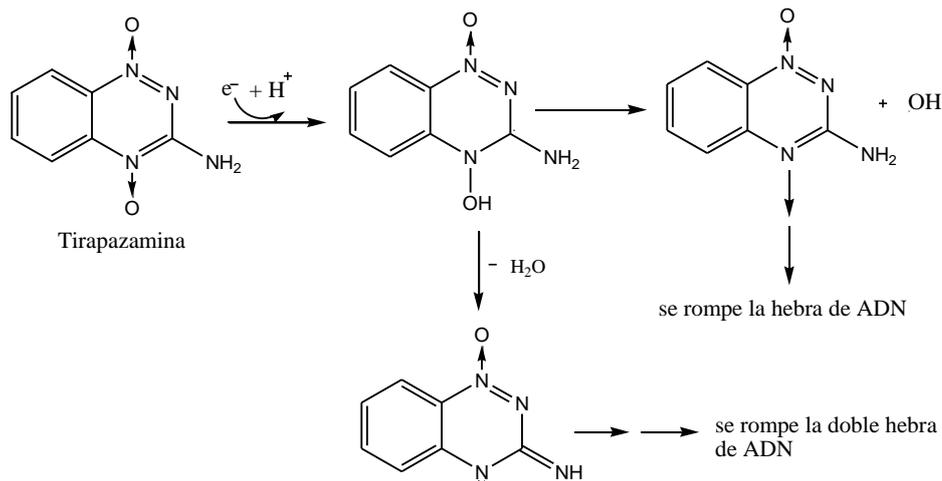


Figura 1.6 – Representación del mecanismo de acción de la tirapazamina Modificada de²⁵.

1.4 Agentes intercalantes de ADN

Un grupo interesante de agentes quimioterápicos comprende moléculas que interactúan con el ADN. Estas moléculas pueden interactuar mediante enlace covalente o electrostático o por medio de la intercalación³⁶.

La intercalación ocurre cuando un ligando con tamaño y naturaleza química adecuada se inserta entre las bases a lo largo del ADN. Estos ligandos suelen ser compuestos policíclicos, aromáticos y planos. La estabilidad de la unión ADN-agente intercalante depende de fuerzas de Van der Waals, hidrofóbicas, enlaces de hidrógeno e interacciones entre orbitales π -moleculares de la molécula aromática y los orbitales π -moleculares de los pares de bases (también aromáticos) de la molécula de ADN³⁷. Esto sugiere que la intercalación es un proceso reversible y, por lo tanto, es posible definir una constante de equilibrio para cada compuesto. La estabilidad del compuesto puede ser estudiada mediante a través del uso de dicroísmo circular, espectroscopía de fluorescencia³⁸, espectroscopía UV visible, cambios en el punto de fusión del ADN (T_m), estudios electroquímicos³⁹, técnicas de biología molecular⁴⁰, entre otros.

Lerman en 1961 fue el primero en describir la interacción no covalente entre la proflavina (un derivado de la acridina) y el ADN, sugiriendo un proceso de intercalación⁴¹. La proflavina (figura 1.7a) es un compuesto policíclico aromático, de tres anillos. Por otro lado, estudios de resonancia magnética nuclear (RMN), sugieren que las moléculas bicíclicas sólo logran intercalarse en el ADN cuando presentan cadenas laterales cargadas positivamente. Los compuestos que presentan tres anillos fusionados, presentan interacciones de apilamiento lo suficientemente fuertes y por lo tanto, no necesitan de cadenas laterales que colaboren en la unión⁴².

Aun no se ha llegado a comprender completamente los mecanismos de acción de los agentes intercalantes, pero se sabe que en muchos casos son capaces de interrumpir la duplicación del ADN así como de introducir mutaciones durante la misma. Tanto la doxorubicina (figura 1.7c) como la mitoxantrona (figura 1.7d) son agentes intercalantes eficaces en el tratamiento de leucemias. Sin embargo, a pesar de su alto grado de afinidad por el ADN poseen una difusión pobre en los tejidos, haciéndolos poco efectivos a la hora de tratar tumores sólidos. Por este motivo, hoy en día se busca desarrollar agentes intercalantes de afinidad moderada, con un coeficiente de difusión tal que permita su utilización en tumores sólidos⁴³.

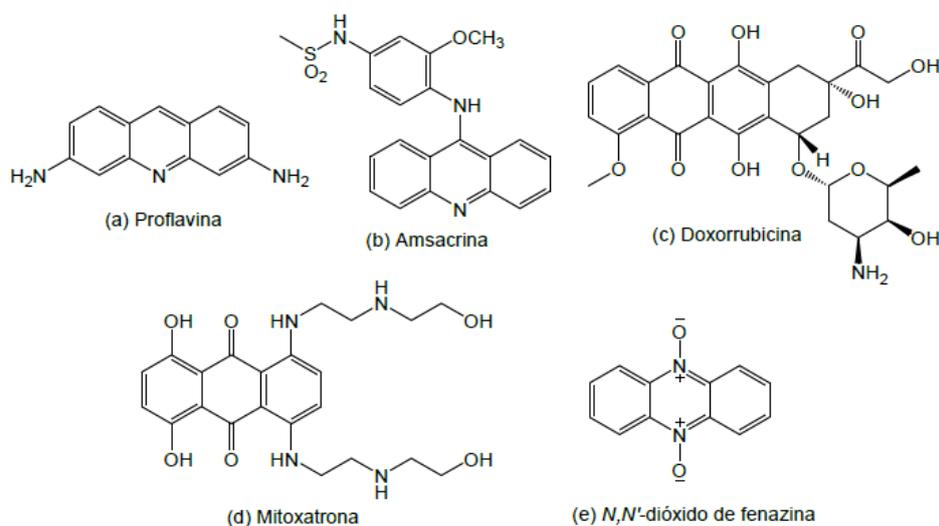


Figura 1.7 – Agentes intercalantes en uso y desarrollo para el tratamiento del cáncer. Extraído de ⁴⁴

Recientemente se han desarrollado agentes antitumorales potenciales que combinan la capacidad de intercalarse en el ADN con un mecanismo de citotoxicidad selectivo en hipoxia. Como ejemplo de estos agentes se pueden nombrar a AQ4N^{25,31} y los derivados de *N*⁵,*N*¹⁰-dióxido de fenazina^{25,45} (figura 1.7e). En todos los casos, la molécula presenta grupos *N*-óxido que se bio-reducen de forma selectiva en hipoxia, incrementando marcadamente su capacidad para intercalarse en el ADN y por lo tanto, su citotoxicidad.

1.5 Bibliografía

- (1) OMS | Cáncer <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/> (acceso Abril 20, 2013).
- (2) Pardee, A.; Stein, G. (2009) *"The Biology and Treatment of Cancer: Understanding cancer"*. 1ª ed. John Wiley & Sons, Ltd. Nueva Jersey, Estados Unidos.
- (3) Baylin, S.; Esteller, M.; Rountree, M.; Bachman, K.; Schuebel, K.; Herman, J. (2001) "Aberrant patterns of DNA methylation, chromatin formation and gene expression in cancer." *Human molecular genetics*, 10, 687-692.
- (4) Alberts, B.; Bray, D.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Watson, J. (2007) *"Molecular biology of the cell"*. 5ª ed. Garland Science, Nueva York, Estados Unidos
- (5) Hartwell, LH.; Kastan, MB. (1994) *"Cell cycle control and cancer."* *Science*, 266, 1821-1828.
- (6) Kastan, M. (2000) *"Biología molecular del cáncer: el ciclo celular, en Cáncer; principios y práctica de oncología"*. 5ª ed. Arán Editorial. S.A. Madrid, España.
- (7) Instituto Nacional de Cancer <http://www.cancer.gov/espanol/cancer/que-es> (acceso abril 9, 2013)
- (8) Alberts, B.; Johnson, A.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Walter, P. (2004) *"Biología molecular de la célula"*. 4ª ed. Omega, Ed. Barcelona, España.
- (9) Muñoz, A.(1997) *"Cáncer. Genes y Nuevas Terapias"*.2ª ed. Editorial Hélice. Madrid, España.
- (10) GLOBOCAN 2008. Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC. <http://globocan.iarc.fr/factsheets/cancers/all.asp> (acceso abril 19, 2013)
- (11) Registro Nacional de Cáncer-Programa Vigilancia Epidemiológica; Comisión Honoraria de Lucha Contra el Cáncer. <http://www.urucan.org.uy>. (acceso abril 18, 2013)
- (12) Lavaggi, M.L. (2009) *"Hipoxia como diana terapéutica para el tratamiento de tumores sólidos: Desarrollo de profármacos selectivos de N,N'-dióxido de fenazina"*. Tesis de Doctorado, Universidad de la República.
- (13) Missailidis, S. (2008) *"Anticancer therapeutics"*. 1ª ed. John Wiley & Sons, Ltd. Chichester, Reino Unido.
- (14) Brown, J.M. (2000) *"Exploiting the hypoxic cancer cell: mechanisms and therapeutic strategie"*. *Molecular medicine today* (vol.6)
- (15) Brown, J.M. and Giaccia, A.J. (1998) *"The unique physiology of solid tumors: Opportunities (and problems) for cancer therapy"*. *Cancer Research*, 58, 1408–1416.
- (16) Brown, J.M. (1999) *"The Hypoxic Cell: A Target for Selective Cancer Therapy"*. *Cancer Research*, 59, 5863–5870.

- (17) Reynolds, T.Y. et al. (1996) "*Genetic instability induced by the tumor microenvironment*". *Cancer Research*, 56, 5754–5757.
- (18) Wouters, B.; Beucken, T.; Magagnin, M.; Lambin, P.; Koumenis, C. (2004) "*Targeting hypoxia tolerance in cancer*". *Drug Resistance Updates* 7, 25–40.
- (19) Kizaka-Kondoh, S.; Tanaka, S.; Harada, H.; Hiraoka, M. (2009) "*The HIF-1-active microenvironment: An environmental target for cancer therapy*". *Advanced Drug Delivery Reviews*, 61, 623–632.
- (20) Gatenby, R.; Gillies, R. (2004) "*Why do cancer cells have high aerobic glycolysis?*" *Nature Reviews in Cancer*, 4, 891-899.
- (21) Greco, O.; Marples, B.; Joiner, M.C.; Scott, S.D. (2003) "*How to overcome (and exploit) tumor hypoxia for targeted gene therapy*". *Journal of Cellular Physiology*, 197, 312-325.
- (22) Crabtree, H.; Cramer, W. (1933) "*The action of radium on cancer cells. II. - Some factors determining the sensitivity of cancer cells to radium*". *Proceeding Royal Society*, 113, 238-250.
- (23) Fyles, A.W. et al. (1998) "*Oxygenation predicts radiation response and survival in patients with cervix cancer*". *Radiotherapy Oncology*, 48, 149–156.
- (24) Lin, A.J.; Cosby, L.A.; Shansky, C.W.; Sartorelli, A.C. (1972) "*Potential bioreductive alkylating agents. 1. Benzoquinone derivatives*". *Journal Medicinal Chemistry*. 15, 1247-1252.
- (25) Cerecetto, H.; González, M.; Lavaggi, M.L. (2006) "*Development of hypoxia selective cytotoxins for cancer treatment: an update*". *Medicinal Chemistry*, 2, 315-327.
- (26) McKeown, S.R.; Coweny, R.L.; Williams, K.J. (2007) "*Bioreductive drugs: from concept to clinic*". *Clinical Oncology*, 19, 427-442.
- (27) Sartorelli, A.; Hodnick, W.; Belcourt, M.; Tomasz, M.; Haffty, B.; Fischer, J.; Rockwell, S. (1994) "*Mitomycin C: a prototype bioreductive agent*". *Oncology Research*, 6, 501-508.
- (28) Cowen, R.L.; Patterson, A.V.; Telfer, B.A. (2003) "*Viral delivery of P450 reductase recapitulates the ability of constitutive overexpression of reductase enzymes to potentiate the activity of mitomycin C in human breast cancer xenografts*". *Molecular Cancer Therapeutics*, 2, 901-909.
- (29) Papadopoulou, M.V.; Ji, M.; Rao, M.K.; Bloomer, W.D. (2003) "*Reductive metabolism of the nitroimidazole based hypoxia-selective cytotoxin NLCQ-1 (NSC 709257)*". *Oncology Research*, 14, 21-29.
- (30) Patterson, L.H. (1993) "*Rationale for the use of aliphatic N-oxides of cytotoxic anthraquinones as prodrug DNA binding agents: a new class of bioreductive agent*". *Cancer Metastasis Reviews*, 12, 119–134

- (31) McKeown, S.R.; Wang, J.; Patel, R.; Hejmadi, M.V.; McIntyre, I.A.; McAleer, J.J.; Patterson, L.H. (1995) "AQ4N: an alkylaminoanthraquinone N-oxides showing bioreductive potential and positive interaction with radiation *in vivo*". *British Journal of Cancer*, 72, 76–81.
- (32) Hunter, F.; Wang, J.; Patel, R.; Hsu, H.L.; Hickey, A.; Hay, M.; Wilson, W. (2012) "Homologous recombination repair-dependent cytotoxicity of the benzotriazine di-N-oxide CEN-209: Comparison with other hypoxia-activated prodrugs". *Biochemical Pharmacology*, 83, 574-595.
- (33) Wang, J. et al. (1992) "Repair of DNA and chromosome breaks in cells exposed to SR 4233 under hypoxia or to ionizing radiation". *Cancer Res.*, 52, 4473–4477.
- (34) Delahoussaye, Y.M. et al. (1997) "Intranuclear metabolism of tirapazamine by matrix associated reductases". *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.* 38, 163 (Abstr. 1095)
- (35) Koch, C.J. (1993) "Unusual oxygen concentration dependence of toxicity of SR-4233, a hypoxic cell toxin". *Cancer Research*, 53, 3992-3997.
- (36) Richards, A.D.; Rodgers, A. (2007) "Synthetic metallomolecules as agents for the control of DNA structure". *Chemical Society Reviews*, 36, 471–483.
- (37) Shui, X.; Peek, M. E.; Lipscomb, L. A.; Gao, Q.; Ogata, C.; Roques, B. P.; Garbay-Jaureguiberry, C.; Wilkinson, A. P.; Williams, L. D. Curr.. (2000) "Effects of cationic charge on three-dimensional structures of intercalative complexes: structure of a bis-intercalated DNA complex solved by MAD phasing". *Medicinal Chemistry*, 7, 59.
- (38) Martínez, R.; Chacón-García, L. (2005) "The Search of DNA-Intercalators as Antitumoral Drugs: What it Worked and What did not Work". *Current Medicinal Chemistry*, 12, 127-151.
- (39) Li, N.; Ma, Y.; Yang, C.; Guo, L.; Yang, X. (2005) "Interaction of anticancer drug mitoxantrone with DNA analyzed by electrochemical and spectroscopic methods". *Biophysical Chemistry*, 116, 199-205.
- (40) Benítez, J.; Guggeri, L.; Tomaz, I.; Costa Pessoa, J.; Moreno, V.; Lorenzo, J.; Avilés, F.; Garat, B.; Gambino, D. (2009) "A novel vanadyl complex with a polypyridyl DNA intercalator as ligand: A potential anti-protozoa and anti-tumor agent". *Journal of Inorganic Biochemistry*, 103, 1386–1394.
- (41) Lerman, L.S. (1961) "Structural considerations in the interaction of deoxyribonucleic acid and acridines". *Journal of Molecular Biology*, 3, 18-30.
- (42) Rescifina, A.; Chiacchio, U.; Corsaro, A.; Piperno, A.; Romeo, R. (2011) "Isoxazolidinyl polycyclic aromatic hydrocarbons as DNA-intercalating antitumor agents". *European Journal of Medicinal Chemistry*, 46, 129-136.

- (43) Denny, W.A.; Atwell, G.J.; Baguley, B.C. (1987) *“Minimal” DNA-intercalating agents as anti-tumour drugs: 2-styrylquinoline analogues of amsacrine*”. *Anticancer Drug Design*, 2, 263-270.
- (44) Lavaggi, M.L.; Nieves, M.; Cabrera, M.; Olea-Azar, C.; López de Cerain, A.; Monge, A.; Cerecetto, H.; González, M. (2010) *“Structural modifications on the phenazine N,N'-dioxide-scaffold looking for new selective hypoxic cytotoxins*”. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 45, 5362-5369.
- (45) Cerecetto, H.; González, M.; Lavaggi, M.L.; Azqueta, A.; López de Cerain, A.; Monge, A. (2005) *“Phenazine 5,10-dioxide derivatives as hypoxic selective cytotoxins*”. *Journal of Medicinal Chemistry*, 48, 21-23.

2. ANTECEDENTES Y DISEÑO DE NUEVOS COMPUESTOS

2.1 Diseño racional de nuevos derivados de N^5N^{10} -dióxido de fenazina

La función *N*-óxido es un grupo funcional que resulta de la adición de un átomo de oxígeno al par de electrones solitario de un átomo de nitrógeno¹. Como se mencionó anteriormente, derivados de *N*-óxido de aminas aromáticas y alifáticas, quinonas y nitrocompuestos han sido descritos como agentes antitumorales bio-reducibles. En tumores hipóxicos, los bajos niveles de oxígeno así como la sobreexpresión de enzimas reductasas, hacen posible la bio-reducción del agrupamiento *N*-óxido². La función *N*-óxido se ha descrito que puede dar lugar a citotoxinas selectivas en hipoxia ya que es bio-reducida en un proceso vía un electrón, generándose un metabolito citotóxico, el radical nitróxido con la capacidad de generar rupturas en las hebras del ADN³.

Paralelamente, la bio-reducción del *N*-óxido vía dos electrones da lugar a la correspondiente amina aromática. La protonación de aminas aromáticas, acentuada por el menor pH extra e intracelular característico de las células tumorales, implica un aumento de su afinidad por ADN. La unión a la molécula al ADN así como su incapacidad para atravesar la membrana plasmática aseguran la selectividad hacia el tejido enfermo⁴. La selectividad hacia las células tumorales también se da debido a que el oxígeno molecular revierte el proceso de bio-reducción en tejidos que están oxigenados.

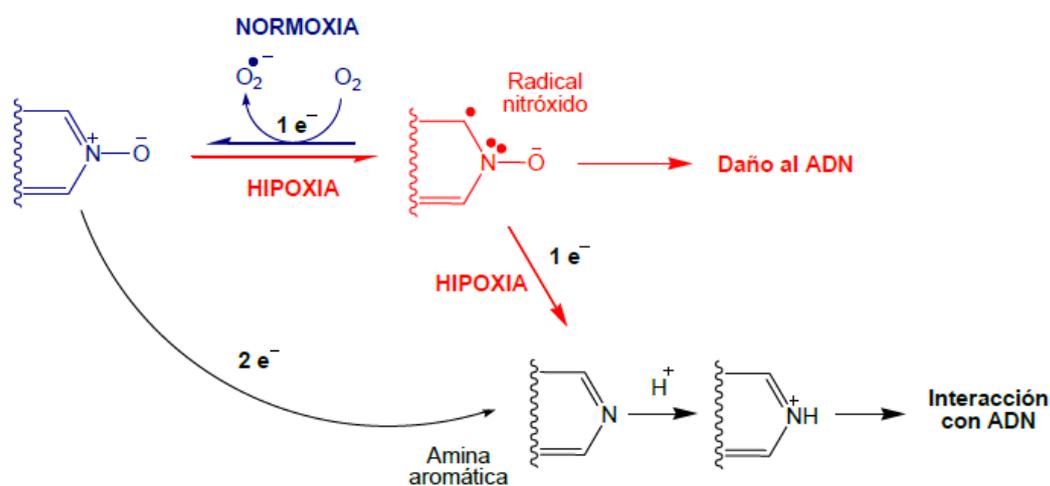


Figura 2.1 – Proceso bio-reductivo de *N*-óxidos de aminas aromáticas.

Por otro lado, se han desarrollado agentes antitumorales que tiene la capacidad de generar daño al intercalarse en el ADN. Entre ellos se pueden mencionar a AQ4N, mitoxantrona y la amsacrina⁵. Éstos presentan un cromóforo plano que consiste en un sistema aromático de tres anillos, responsable del fenómeno de intercalación entre pares de bases.

Desde el año 1994 nuestro grupo de investigación ha desarrollado diferentes series de compuestos derivados del sistema *N*-óxido como potenciales agentes bio-reducibles⁶⁻²¹.

En particular se han sintetizado derivados de *N*⁵,*N*¹⁰-dióxido de fenazinas (figura 2.2) como profármacos intercalantes con ADN posterior al proceso de bio-reducción en condiciones hipóxicas¹⁷⁻²¹. Dichos derivados presentan dos grupos *N*-óxido, al igual que el compuesto tirapazamina que se encuentra actualmente en estudios de fase clínica 3 mostrando resultados promisorios para su uso en combinación con cisplatino y radioterapia. En condiciones de hipoxia, la Tirapazamina reducida generando un derivado capaz de generar daño al ADN²². Así mismo, el heterociclo fenazina es un cromóforo plano muy similar al anillo tricíclico de la mitoxantrona.

Adicionalmente, debido a que los grupos *N*-óxido forman parte del heterociclo, su reducción y la concomitante protonación de la amina resultante, favorecería de forma directa la intercalación del derivado reducido en la molécula de ADN.

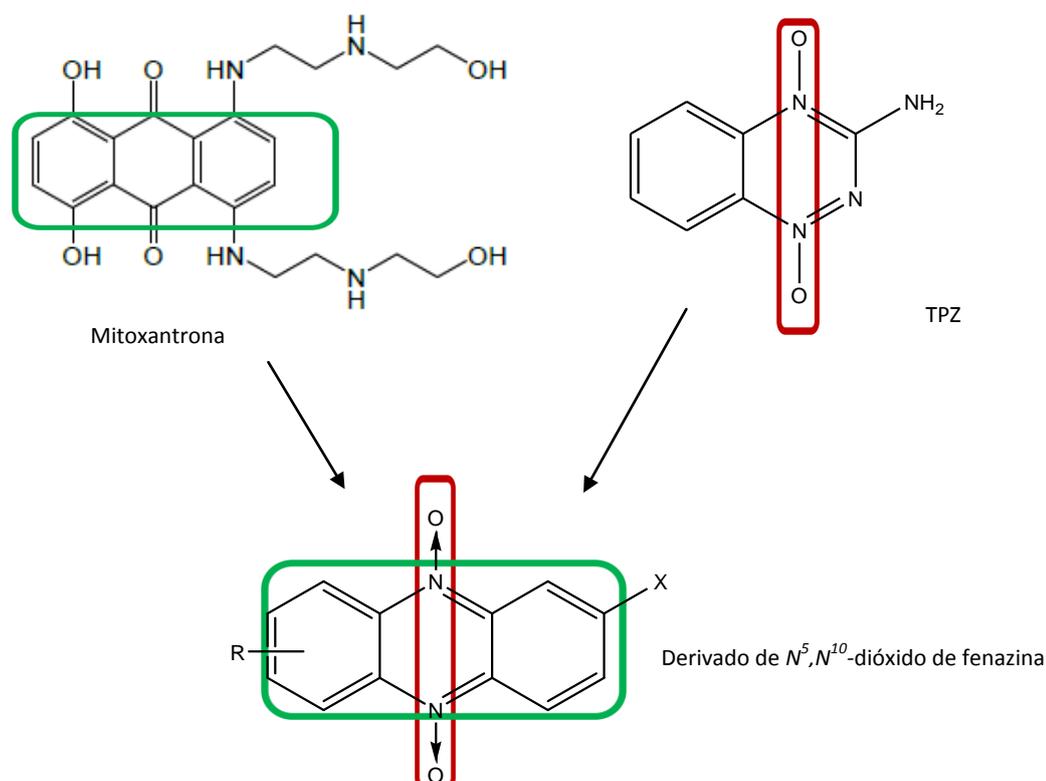
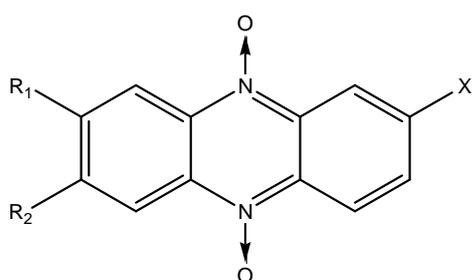


Figura 2.2 – Diseño de potenciales profármacos bio-reducibles sintetizados en este trabajo, derivados de *N*⁵,*N*¹⁰-dióxido de fenazina.

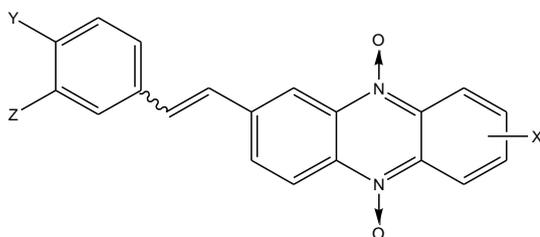
En trabajos previos se ha determinado que los sustituyentes presentes en el anillo de fenazina tienen una clara influencia sobre su interacción con el ADN además de afectar el perfil de selectividad de estos compuestos^{21,23}. Recientemente nuestro grupo de investigación desarrolló una nueva familia de derivados N^5, N^{10} -dióxido de fenazina que combinaban las dos propiedades ya mencionadas con una tercer característica: la incorporación de sustituyente para que favorezcan la interacción con el ADN²¹. Los sustituyentes ensayados se pueden dividir en dos grupos. Aquellos que presentan un sustituyente derivado de fenilo o arilitenilo que tienen la potencialidad de intercalarse en el ADN, dando así lugar a agentes bis-intercalantes (figura 2.4 8-15). A su vez otros derivados incorporan el grupo funcional aminoguanidona (figura 2.4 16-17) que puede ser protonado e interaccionar esqueleto de azúcar-fosfato. Todos los nuevos derivados fueron sintetizados de tal manera que la sustitución del ciclo de la fenazina fue realizado hacia el oeste de la molécula (figura 2.4).



1: $R_1 = H, R_2 = H, X = OH$

2: $R_1 = H, R_2 = H, X = NH_2$

3: $R_1 = H, R_2 = Br, X = OH$



8: $X = NH_2, Y = Z = H, trans$

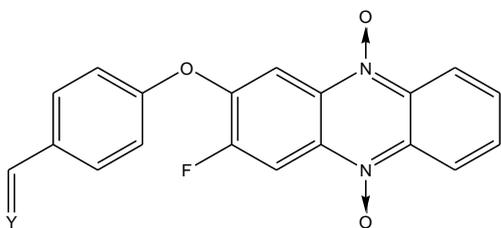
9: $X = OH, Y = Z = H, trans$

10: $X = NH_2, Y = Cl, Z = H, trans$

11: $X = OH, Y = Cl, Z = H, trans$

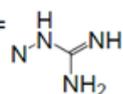
12: $X = NH_2, Y-Z = -OCH_2O-, cis$

13: $X = OH, Y-Z = -OCH_2O-, cis$



14: $X = NH_2, Y = O$

15: $X = OH, Y = O$

16: $X = NH_2, Y =$ 

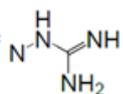
17: $X = OH, Y =$ 

Figura 2.4 - Familia de derivados N^5, N^{10} -dióxido de fenazina sintetizados por nuestro grupo de investigación^{21,23}.

A fin de determinar la capacidad de interacción de todos los compuestos (figura 2.4) con el ADN, se estudió por espectroscopía de fluorescencia el grado de afinidad de cada compuesto con ADN. Mediante este método se pueden observar diversas interacciones como ser intercalación, cambios conformacionales e interacción con el surco menor del ADN^{24,25}.

En el estudio realizado, la presencia del grupo amino en la posición 2 del compuesto **2**, parecería favorecer la interacción con ADN en comparación con el grupo hidroxilo en la posición 2 del derivado **1**. Este resultado fue observado no solo comparando los derivados **1** y **2** sino también los derivados **8** y **9** en los cuales el derivado 2-amino siempre presenta una mayor Ksv que el 2-hidroxi. Cuando se comparó las parejas **1 - 15** y **2 - 14** se observó claramente que la presencia del sustituyente 4-formilfenoxi estaría potenciando la interacción de los compuestos con ADN, sin embargo, al transformar dicho sustituyente en un

4-aminoguanidonilfenoxi para dar lugar a los derivados **16** y **17**, la Ksv disminuye rotundamente. También resultó interesante comparar los compuestos **1** y **2** con los

derivados **8** y **9**. Se pudo afirmar que, en general, el sustituyente arileténilo incrementa la capacidad de los compuestos de interaccionar con el ADN, siendo el que lo hace con mayor eficiencia el sustituyente fenieténilo presente en los derivados **8** y **9** (Ksv= 24,4 ± 2,8 y 14,3 ± 0,4 respectivamente).

En el presente trabajo se buscará determinar si las cadenas laterales de los profármacos generan interacción con ADN de manera que permita realizar un estudio de la relación entre la estructura de la molécula y la capacidad de interacción con ADN. Basándonos en estos antecedentes es que nos propusimos en el presente trabajo, ampliar la familia de compuestos de derivados de N^5, N^{10} -dióxido de fenazinas como agentes bio-reducibles en hipoxia capaces de interaccionar con el ADN. Los nuevos compuestos incorporan modificaciones que puedan dar información sobre la influencia de la sustitución del hidroxilo de la fenazina con cadenas hidroxialquílicas.

Derivado	Ksv ($\times 10^{-3}$)
1	1,0 ± 0,8
2	7,3 ± 1,7
8	24,4 ± 2,8
9	14,3 ± 0,4
10	10,1 ± 0,4
11	15,2 ± 0,8
12	2,8 ± 0,2
13	9,3 ± 0,7
14	10,7 ± 1,4
15	8,3 ± 0,4
16	0,1 ± 0,2
17	0,1 ± 0,1
TB	12,6 ± 1,5

Tabla 2.1 - Constantes de Stern-Volmer (Ksv) calculadas experimentalmente para los compuestos **1-2**, **8-17** y para el azul de toluidna (TB).

2.2 Bibliografía

- (1) Brown, B.R. (1994) *"The Organic Chemistry of Aliphatic Compounds"*. Clarendon Press:Oxford.
- (2) Saunders, M.; Patterson, A.; Chinje, E.; Harris, A.; Stratford, I. (2000) *"NADPH:cytochrome c (P450) reductase activates tirapazamine (SR4233) to restore hypoxic and oxycytotoxicity in an aerobic resistant derivative of the A549 lung cancer cell line"*. British Journal of Cancer. 82, 651-656.
- (3) Brown, J.M. (1993) *"SR 4233 (tirapazamine): a new anticancer drug exploiting hypoxia in solid tumours"*. British Journal of Cancer, 67, 1163-1170.
- (4) Cerecetto, H.; González, M.; Lavaggi, M.L. (2006) *"Development of hypoxia selective cytotoxins for cancer treatment: an update"*. Medicinal Chemistry, 2, 315-327.
- (5) Denny, W.A.; Atwell, G.J.; Baguley, B.C. (1987) *"Minimal DNA-intercalating agents as anti-tumour drugs: 2-styrylquinoline analogues of amsacrine."* Anticancer Drug Design, 2, 263-270.
- (6) 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. (1995) *"Hypoxia-selective agents derived from quinoxaline 1,4-di-N-oxides"*. Journal of Medicinal Chemistry. 38, 1786-1792.
- (7) 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. (1995) *"Hypoxia-selective agents derived from 2-quinoxalinecarbonitrile 1,4-di-N-oxides"*. 2. Journal of Medicinal Chemistry. 38, 4488-4494.
- (8) Monge, A.; López de Ceráin, A.; Ezpeleta, O.; Cerecetto, H.; Dias, E.; Di Maio, R.; González, M.; Onetto, S.; Risso, M.; Seoane, G.; Zinola, F.; Olea-Azar, C. (1998) *"1,2,5-Oxadiazole N-oxide derivatives as hypoxia-selective cytotoxins. Structureactivity relationships"*. Pharmazie. 53, 698-702.
- (9) Cerecetto, H.; González, M.; Risso, M.; Seoane, G.; López de Ceráin, A.; Ezpeleta, O.; Monge, A.; Suescun, L.; Mombrú, A.; Bruno, A. M. (2000) *"Synthesis and biological evaluation of 1,2,5-oxadiazole N-oxide derivatives as potential hypoxic cytotoxins and DNA-binders"*. Archive der Pharmazie. 333, 387-393.
- (10) Cerecetto, H.; González, M.; Onetto, S.; Risso, M.; Saenz, P.; Seoane, G.; Monge, A.; López de Ceráin, A.; Ezpeleta, O.; Olea-Azar, C.; Bruno, A. M. (2001) *"1,2,4-Triazine N-oxide and di-N-oxide derivatives. Synthesis and evaluation as hypoxia selective cytotoxins"*. Medicinal Chemistry Research. 10, 328-337.

- (11) Boiani, M.; Cerecetto, H.; González, M.; Risso, M.; Olea-Azar, C.; Ezpeleta, O.; López de Ceráin, A.; Monge, A. (2001) *"1,2,5-Oxadiazole N-oxide derivatives as potential anti-cancer agents: Synthesis and biological evaluation. Part IV"*. European Journal of Medicinal Chemistry. 36, 771-782.
- (12) Cerecetto, H.; González, M.; Onetto, S.; Saenz, P.; Ezpeleta, O.; López de Ceráin, A.; Monge, A. (2004) *"1,2,4-Triazine N-oxide derivatives: studies as potential hypoxic cytotoxins. Part II"*. Archive der Pharmazie. 337, 247-258.
- (13) Cerecetto, H.; González, M.; Risso, M.; Saenz, P.; Olea-Azar, C.; Bruno, A.M.; Azqueta, A.; López de Ceráin, A.; Monge A. (2004) *"1,2,4-Triazine N-oxide derivatives: Studies as potential hypoxic cytotoxins. Part III"*. Archive der Pharmazie. 337, 271-280.
- (14) Torre, M.; Gambino, D.; Araujo, J.; Cerecetto, H.; González, M.; Lavaggi, M.L.; Azqueta, A.; López de Ceráin, A.; Monge Vega, A.; Abram, U.; Costa-Filho, A.; (2005) *"Novel Cu(II) quinoxaline N¹,N⁴-dioxide complexes as selective hypoxic cytotoxins"*. European Journal of Medicinal Chemistry, 40, 473-480.
- (15) Aguirre, G.; Boiani, M.; Cerecetto, H.; Fernández, M.; González, M.; León, E.; Pintos, C.; Raymondo, S.; Arredondo, C.; Pacheco, J. P.; Basombrío, M. A. (2006) *"Furoxan derivatives as cytotoxic agents: Preliminary in vivo antitumoral activity studies"*. Pharmazie. 61, 54-59.
- (16) Cerecetto, H.; González, M.; Onetto, S.; Risso, M.; Rey, A.; Giglio, J.; León, E.; León, A.; Pilatti, P.; Fernández M. (2006) *"Synthesis and characterization of thiol containing furoxan derivatives as coligands for the preparation of potential bioreductive"*. Archive der Pharmazie. 339, 59-66.
- (17) Lavaggi, M.L.; Cabrera, M.; González, M.; Cerecetto, H. (2008) *"Differential enzymatic reductions governing the differential hypoxia-selective cytotoxicities of phenazine 5,10-dioxides"*. Chemical Research Toxicology, 21, 1900-1906.
- (18) Lavaggi, M.L.; Cabrera, M.; Aravena, M.A., Olea-Azar, C.; López de Ceráin, A.; Monge, A.; Pachón, G.; Cascante, M.; Bruno, A.M.; Pietrasanta, L.I.; González, M.; Cerecetto, H. (2010) *"Study of benzo[a]phenazine 7,12-dioxide as selective hypoxic cytotoxin-scaffold. Identification of aerobic-antitumoral activity through DNA fragmentation"*. Bioorganic and Medicinal Chemistry, 18, 4433-4440.
- (19) Cunha, J.D.; Lavaggi, M.L.; Abasolo, M.I.; Cerecetto, H.; González M. (2011) *"2D and 3D-quantitative structure activity relationship studies for a series of phenazine N,N'-dioxide as antitumour agents"*. Chemical and Biology Drug Design, doi:10.1111/j.17470285.2011.01237.x.

- (20) 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 Ceráin, A.; Monge, A.; Cerecetto, H.; González, M. (2011) *"Novel phenazine 5,10-dioxides release •OH in simulated hypoxia and induce reduction of tumour volume in vivo"*. ISRN Pharmacology, Article ID 314209, doi:10.5402/2011/314209.
- (21) Lavaggi, M.L.; Nieves, M.; Cabrera, M.; Olea-Azar, C.; López de Ceráin, A.; Monge, A.; Cerecetto, H.; González, M. (2010) *"Structural modifications on the phenazine N,N'-dioxide-scaffold looking for new selective hypoxic cytotoxins"*. European Journal of Medicinal Chemistry, 45, 5362-5369.
- (22) Koch, C.J. (1993) *"Unusual oxygen concentration dependence of toxicity of SR-4233, a hypoxic cell toxin"*. Cancer Research, 53, 3992-3997.
- (23) Gonda, M.; Nieves, M.; Nunes, E.; López de Ceráin, A.; Monge, A.; Lavaggi, M.L.; González, M.; Cerecetto, H. (2013) *"Phenazine N,N'-dioxide scaffold as selective hypoxic cytotoxin pharmacophore. Structural modifications looking for further DNA topoisomerase II-inhibition activity"*. Medicinal Chemistry Communications, 4, 595-607.
- (24) Williams, A.; Cheliout Dasilva, S.; Bhatta, A.; Rawal, B.; Liu, M.; Korobkva E. (2012) *"Determination of the drug-DNA binding modes using fluorescence-based assays"*. Analytical Biochemistry, 422, 66-73.
- (25) Chi, Z.; Liu, R.; Sun, Y.; Wang, M.; Zhang, P.; Gao, C. (2010) *"Investigation on the toxic interaction of toluidine blue with calf thymus DNA"*. Journal of Hazardous Materials, 175, 274-278.

3. OBJETIVOS

En base a los resultados preliminares, detallados en la sección anterior, se plantean los siguientes objetivos:

- 1) Diseño de nuevos derivados de N^5, N^{10} -dióxido de fenazina (figura 3.1) *O*-sustituidos

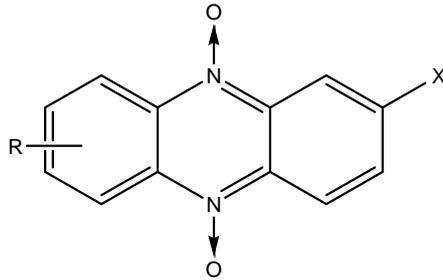


Figura 3.1 – Estructura general de los derivados de N^5, N^{10} -dióxido de fenazina.

- 2) Síntesis y caracterización espectroscópica de derivados de N^5, N^{10} -dióxido de fenazina diseñados en el objetivo anterior.
- 3) Evaluación biológica de los derivados sintetizados y anteriormente desarrollados en el grupo.
 - a. Evaluación de la interacción con ADN *in vitro*. Aproximación al mecanismo de acción.
 - b. Estudios de relación estructura-interacción con ADN *in vitro*.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Síntesis química

En el presente trabajo se planteó como objetivo, el desarrollo una nueva familia de derivados de N^5, N^{10} -dióxido de fenazina (figura 4.1) como potenciales agentes antitumorales que combinan la capacidad de intercalarse en el ADN con un mecanismo de citotoxicidad selectivo en hipoxia.

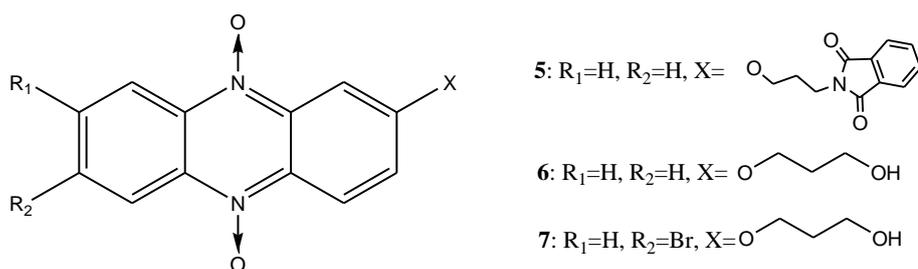


Figura 4.1 - Nueva familia de derivados de N, N' -dióxido de fenazina que se planean sintetizar en la presente tesina.

La formación del heterociclo de N^5, N^{10} -dióxido de fenazina se lleva a cabo en 2 etapas que serán descritas en detalle a continuación. Luego se detallará las reacciones de sustitución sobre el ciclo de fenazina para la obtención de los diferentes derivados deseados.

4.1.1 Síntesis de los derivados de N -óxido de benzo [1,2-c]1,2,5-oxadiazol

A partir de las *o*-nitroanilinas disponibles comercialmente u obtenidas por el grupo de investigación¹ se produce una oxidación de las mismas con hipoclorito de sodio para conducir al heterociclo de interés N -óxido de benzo[1,2-c]1,2,5-oxadiazol, benzofuroxano².

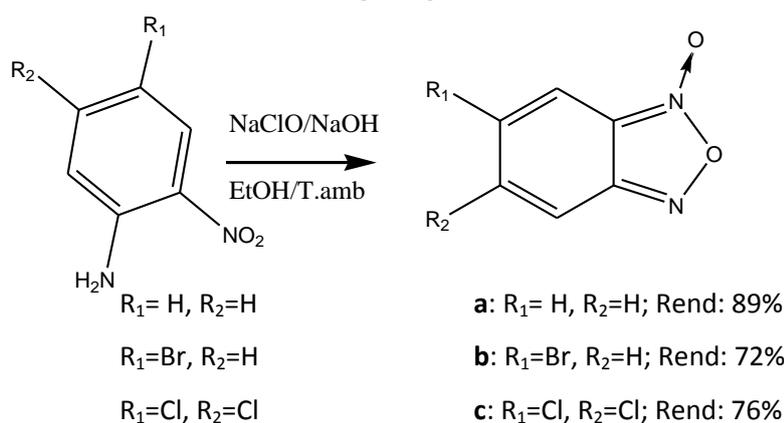
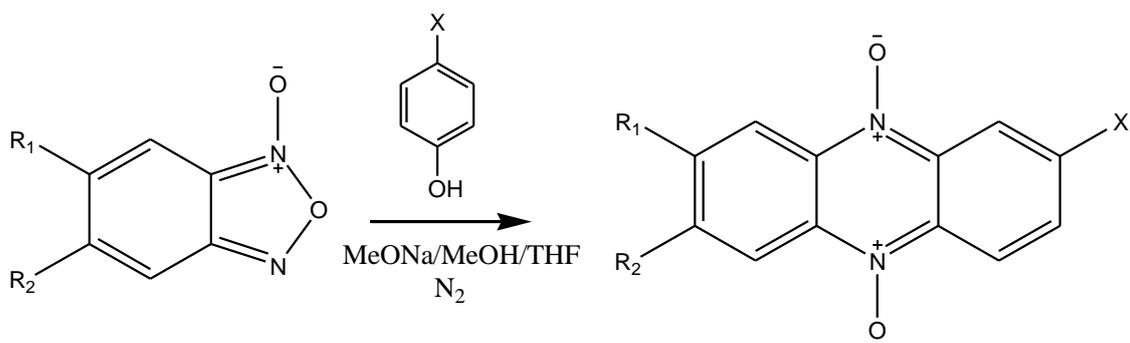


Figura 4.2 - Condiciones generales de síntesis de N -óxido de benzo [1,2-c]1,2,5-oxadiazol.

El avance de todas las reacciones se controla por cromatografía en capa fina (CCF). El producto sintetizado se verifica por CCF, comparándolo con un patrón ya sintetizado¹. Los benzofuroxanos se utilizan en las siguientes etapas sin posteriores purificaciones.

4.1.2 Síntesis del heterociclo N^5, N^{10} -dióxido de fenazina

Una vez sintetizados los intermedios benzofuroxanos, se los hace reaccionar con *p*-aminofenol o *p*-hidroquinona, en medio básico, para obtener los correspondientes N^5, N^{10} -dióxido de 2-aminofenazinas o N^5, N^{10} -dióxido de 2-hidroxifenazinas respectivamente. Para ello se sigue el proceso de síntesis propuesto por Ludwig y Baumgartel³ para la reacción de Beirut. Esta reacción describe la de expansión del heterociclo benzofuroxano con distintos nucleófilos entre ellos fenolatos. Se utiliza como base, generadora del fenolato, metóxido de sodio. Los disolventes de elección, mezcla de THF y MeOH, permiten que los productos de interés precipiten en el medio de reacción.



a: $R_1 = H, R_2 = H$

a: $R_1 = H, R_2 = H$

b: $R_1 = H, R_2 = Br$

c: $R_1 = Cl, R_2 = Cl$

1: $R_1 = H, R_2 = H, X = OH$; Rend: 35%

2: $R_1 = H, R_2 = H, X = NH_2$; Rend: 30%

3: $R_1 = H, R_2 = Br, X = OH$; Rend: 23%

4: $R_1 = Cl, R_2 = Cl, X = OH$; Rend: 26%

Figura 4.3 - Condiciones generales para la Síntesis del heterociclo N^5, N^{10} -dióxido de fenazina.

El avance de todas las reacciones se controla por cromatografía en capa fina (CCF). El producto sintetizado se verifica por CCF, comparándolo con un patrón ya sintetizado¹. Los derivados de N^5, N^{10} -dióxido de fenazina se utilizan en las siguientes etapas sin posteriores purificaciones.

La reacción transcurre según el mecanismo propuesto en la figura 4.4 Una vez formado el carbanión en el carbono adyacente al grupo hidroxilo, del derivado fenólico correspondiente, se produce un ataque de éste sobre el nitrógeno más electrofílico del benzofuroxano. Posteriormente, el nitrógeno nucleofílico, generado en el intermedio, ataca al carbono

carbonílico generado en el proceso. La formación del anillo de fenazina se completa con la aromatización del anillo por la pérdida de una molécula de agua⁴.

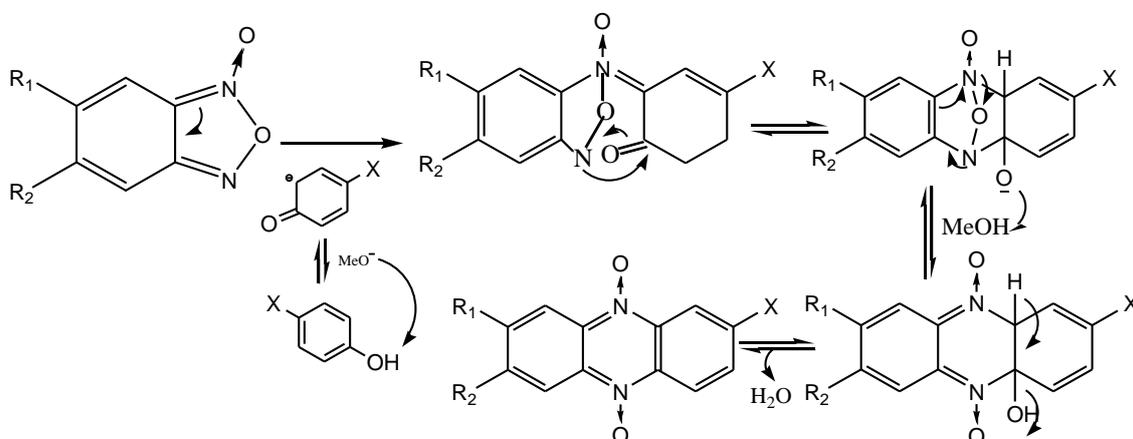


Figura 4.4 - Mecanismo general de reacción de formación de N^5,N^{10} -dióxido de fenazina⁴.

Como agente nucleófilo se utilizan dos fenoles diferentes, que conducen a derivados que pueden ser modificados a través de procedimientos químicos diferenciales. Cuando se utiliza *p*-aminofenol se obtiene la 2-aminofenazina correspondiente, al utilizar *p*-hidroquinona se genera el análogo 2-hidroxifenazina, con rendimientos moderados.

Cuando se parte de benzofuroxanos monosustituídos, debido al tautomerismo existente, el procedimiento de expansión puede conducir a la mezcla de las correspondientes fenazinas 7- y 8-sustituídas¹, hecho que se evidencia espectroscópicamente por 1H -RMN. En este caso sólo el derivado 3, podría obtenerse como una mezcla de isómeros, pero en trabajos previos se ha observado que el 7-isómero es el que se obtiene mayoritariamente (95%)⁴.

4.1.3 Síntesis y caracterización fisicoquímica de N^5,N^{10} -dióxido de 2-ftamidilpropiloxifenazina

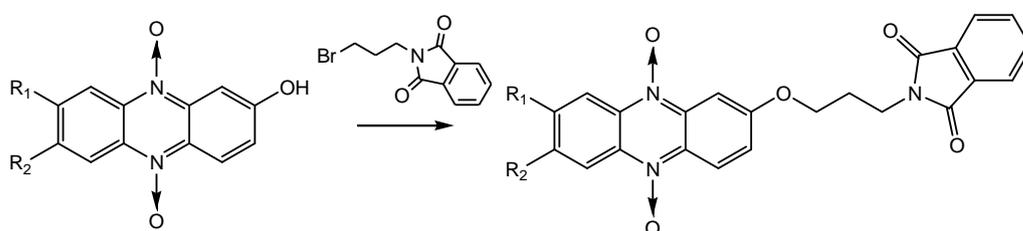


Figura 4.5 - Síntesis de los derivados de ftamidilpropiloxifenazina.

En la síntesis se realiza la *O*-alquilación a través de la reacción de sustitución de 3-bromo-*N*-propilftalimida por un mecanismo de sustitución nucleofílica (S_N2) sobre el hidroxilo de la fenazina. Se intentaron varias condiciones hasta lograr obtener el producto.

R1	R2	Condiciones	Resultado
Cl	Cl	$K_2CO_3/18-C-16/KI/ACN/40\text{ }^\circ C, 48hrs.$	Se observa descomposición del reactivo, no se obtiene el producto.
H	H	$K_2CO_3/18-C-16/KI/ACN/100\text{ }^\circ C, 8\text{ atm}, 700\text{ W}$	A medida que avanza la reacción se observan en la CCF dos productos. Se purificaron y se analizaron por 1H -RMN, pero no se observaron las señales correspondientes a la cadena alifática.
H	H	$K_2CO_3/18-C-16/Acetona/(CH_3(CH_2)_3)_4NI$ T. ambiente, 72hrs.	Se obtiene un sólido naranja que a través de 1H -RMN y espectrometría de masas se comprobó ser el producto deseado. Rendimiento de 47%

Tabla 4.1 - Condiciones de reacción ensayadas para obtener los derivados de ftamidilpropiloxifenazina.

En todos los casos se utiliza K_2CO_3 como base y el éter corona se utiliza para secuestrar los iones K^+ dejando mas disponible la base para la reacción. La reacción transcurre según el mecanismo planteado en la figura 4.6.

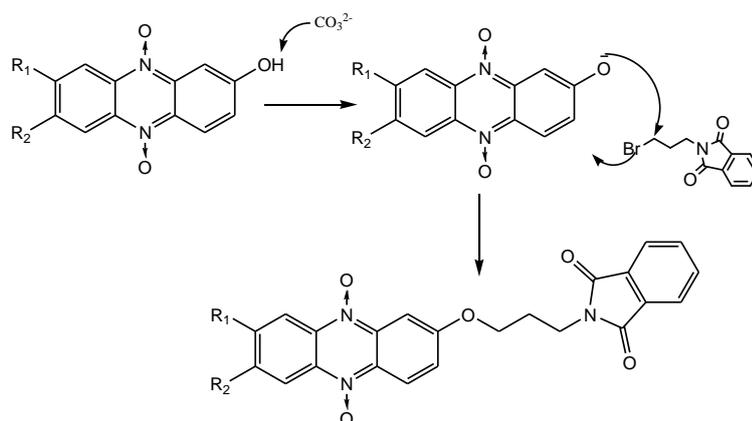


Figura 4.6 – Mecanismo general de la reacción de sustitución con 3-bromo-*N*-propilftalimida.

En algunas reacciones se agregó también ioduro de potasio (KI) para favorecer la sustitución del iodo por el bromo, ya que de los halógenos, el iodo es el mejor grupo saliente⁵.

En primer lugar, se puede decir que no se esperaban altos rendimientos en esta reacción, debido a que el grupo OH es poco nucleófilo debido a que es un grupo electrón-dador por efecto resonante. En ese sentido, no se eligió trabajar con las 2-aminofenazinas debido a su menor nucleofilia.

Si se observan las diferentes condiciones que se intentaron, se tomaron en cuenta distintos aspectos. Por un lado se pudo determinar que el disolvente afecta el rendimiento de la reacción. De hecho el disolvente afecta las velocidades de muchas reacciones S_N2 . Los disolventes próticos desaceleran las reacciones S_N2 rodeando al nucleófilo reactivo, en un proceso llamado solvatación. A diferencia de éstos, los disolventes polares apróticos (que no forman enlaces de hidrógeno) aumentan las velocidades de las reacciones porque elevan la energía del estado fundamental del nucleófilo. Además como no pueden formar enlaces de hidrógeno, los nucleófilos se encuentran menos rodeados de moléculas de disolvente, con lo que su reactividad se ve potenciada. Son adecuados en este tipo de reacciones disolventes como ACN, DMF, acetona entre otros. En un primer momento, se intentaron las reacciones con ACN, pero se observó que las fenazinas eran poco solubles, y se comenzó a utilizar acetona, ya que la solubilidad de la fenazina aumentaba significativamente^{5,6}. A su vez, para mejorar la solubilidad del reactivo se agregó a la reacción catalizador de transferencia de fase, ioduro de tetrametilamonio ($(CH_3(CH_2)_3)_4NI$).

Se logró obtener el producto utilizando como reactivo la N^5, N^{10} -dióxido de 2-hidroxifenazina (figura 4.7). A su vez se intentó sustituir el derivado N^5, N^{10} -dióxido de 2-amino-7,8-diclorofenazina no se obtuvo producto probablemente debido a que sustituyentes con efecto inductivo electrón atrayente predominante disminuyen aún más la nucleofilia del hidroxilo.

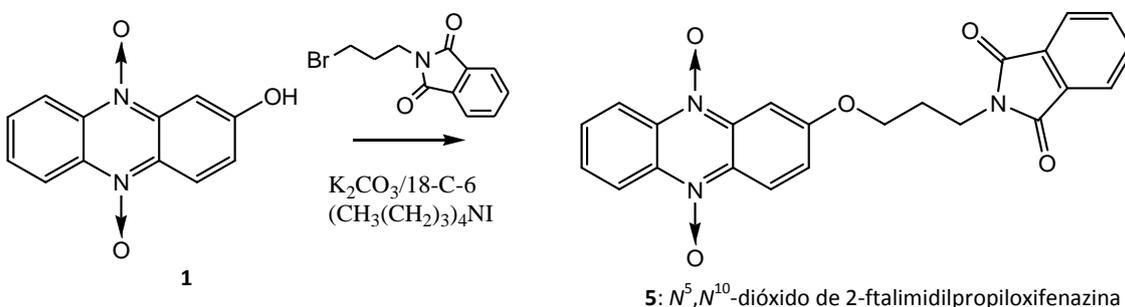


Figura 4.7 - Síntesis de N^5, N^{10} -dióxido de 2-ftalimidilpropiloxifenazina (**5**).

El análisis espectroscópico (^1H -RMN) del producto obtenido confirma la estructura propuesta. La caracterización espectroscópica del producto se realizó en base a los estudios de los espectros de correlación homonuclear (COSY) y heteronuclear (a un enlace de distancia, HSQC, y a más de uno enlace de distancia, HMBC).

Para la caracterización del derivado **5** también se realizó la espectrometría de masa de tipo TOF MS ES+. En la figura 4.8 se observa claramente el pico M^+ (415,15) y la pérdida de los oxígenos de los *N*-óxidos (399,15, 383,15).

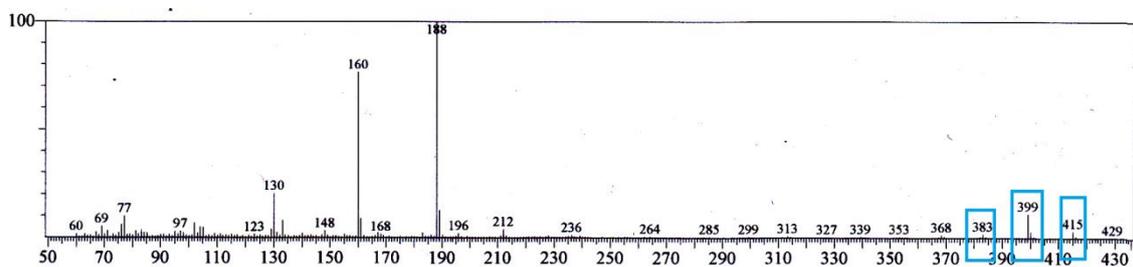


Figura 4.8 - Espectro de masas del derivado **5**.

A continuación se describirá a modo de ejemplo la caracterización del derivado **6**. En el espectro de ^1H -RMN correspondiente se pueden distinguir dos principales regiones, la región de los protones correspondientes a la cadena alquílica, y la región de los protones del heterociclo de fenazina.

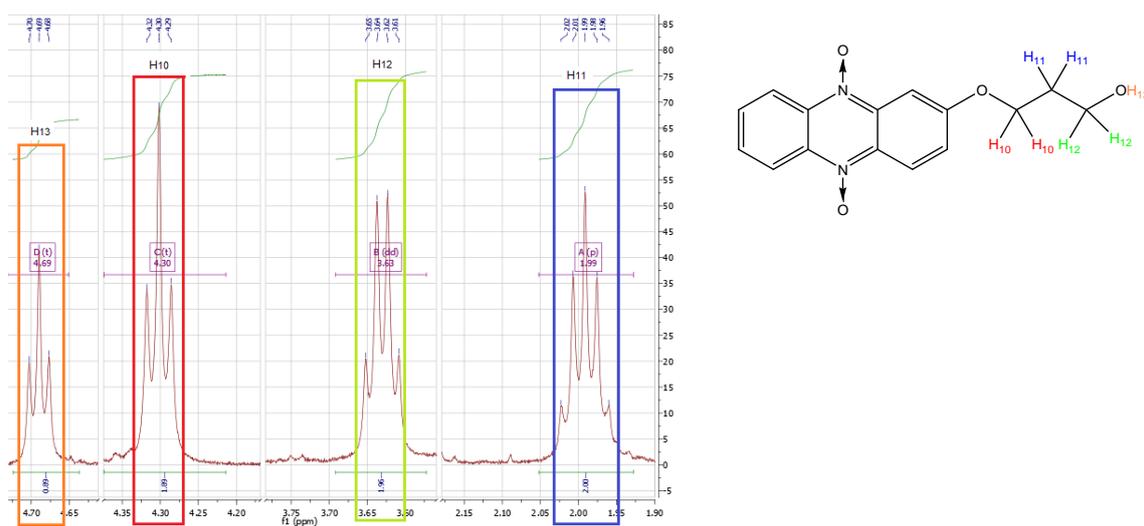


Figura 4.10- Se muestra la región entre 1.90 y 4.75 ppm del espectro ^1H -RMN de N^5,N^{10} -dióxido de 2-hidroxi-propiloxifenazina (derivado **6**, estructura a la derecha del espectro) procesado con software MestReNova. Disolvente DMSO; temperatura de adquisición 22 °C.

En la figura 4.10 se puede visualizar la asignación de los protones correspondientes a la cadena alquílica. En primer lugar, de la interpretación del espectro de correlación homonuclear (COSY) se pudo asignar la señal de los protones H_{11} (un multiplete a 1.99 ppm), ya que ésta señal está correlacionada con la señal de los protones H_{10} y H_{12} . También se pudo identificar una señal del triplete con un desplazamiento de 4,30 ppm con una constante de acoplamiento de 6,35 Hz correspondiente a los protones H_{10} y una señal del tipo doblete de triplete a 3,66 ppm correspondiente a los protones H_{12} . La señal de los protones H_{12} se encuentra desdoblada no sólo por la presencia de los protones H_{11} sino también por la presencia del protón H_{13} , protón que corresponde al alcohol. La señal que se corresponde con H_{13} se observa con un desplazamiento de 4,69 ppm y es una señal del tipo triplete con una constante de acoplamiento de 5,21 Hz. En la figura 4.11 se presenta el espectro de correlación homonuclear (COSY) ^1H - ^1H que permite identificar inequívocamente el acoplamiento escalar protón-protón. En este tipo de espectros de 2D las señales que toman importancia son las que se encuentran fuera de la diagonal ya que estas son las que resultan de la interacción de espines distintos que

están acoplados de forma escalar. Los círculos dibujados en el espectro permiten una mejor visualización del acoplamiento escalar protón-protón. Con el círculo azul se puede ver el acoplamiento escalar entre $H_{11}:H_{10}$ (1,99:3,66) que por encontrarse a un enlace de distancia deben aparecer correlacionados en el experimento de correlación homonuclear (COSY). Por la misma razón, en el círculo rojo también se puede ver el acoplamiento escalar entre $H_{11}:H_{12}$ (1,99:4,30). Por último, en el círculo verde se puede ver el acoplamiento escalar entre $H_{13}:H_{12}$ (4,69:3,66).

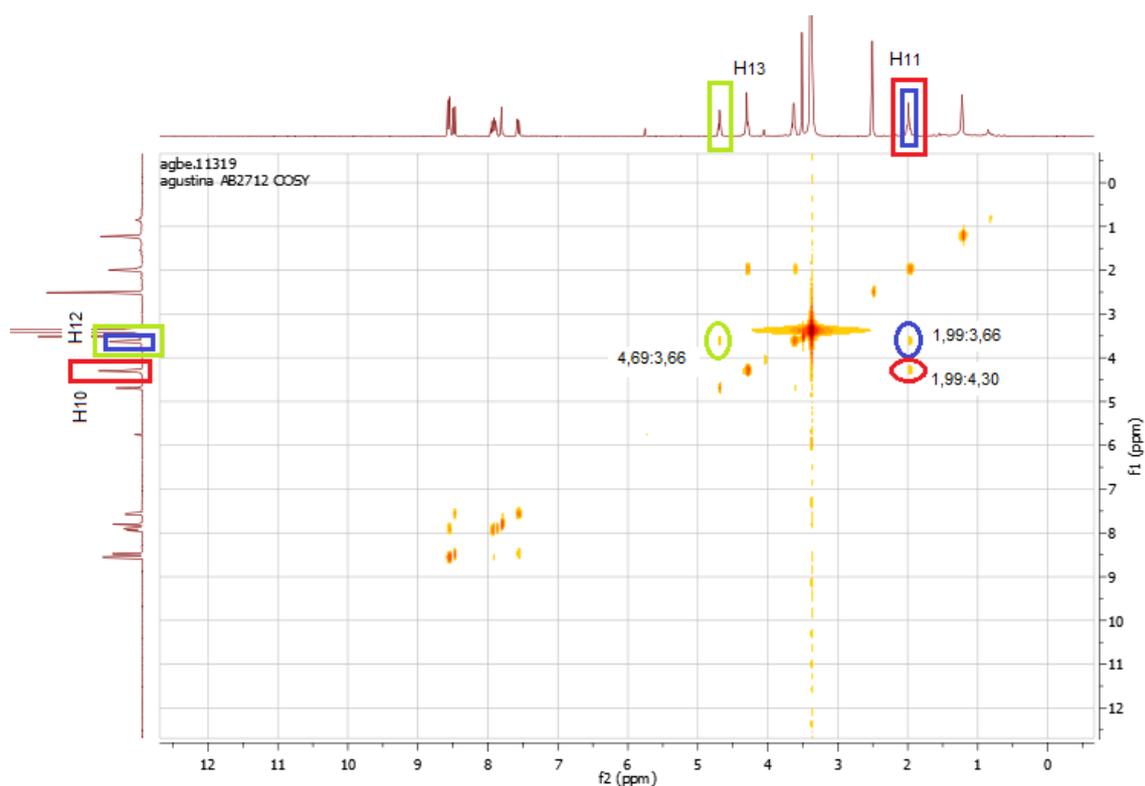


Figura 4.11 - Espectro COSY del derivado **6**. Los círculos indican el acoplamiento escalar entre núcleos vecinos alifáticos.

Paralelamente analizando la figura 4.12 fue posible elucidar las señales del anillo de fenazina identificando las señales de los hidrógenos en posición 1 y 3, que presentan una constante de acoplamiento en meta muy característica. Además la señal del protón H_1 se distingue de la señal del protón H_4 , ya que la presencia del oxígeno del alcohol hace éste protón este menos apantallado y tenga un desplazamiento menor. La señal de H_1 con un desplazamiento químico de 7,75 ppm corresponde a una señal con multiplicidad del tipo doblete con una constante de acoplamiento $J=2,56$ Hz y una área de integración igual a 1. La señal del H_3 es fácilmente identificable por ser una señal del tipo doblete de doblete, consecuencia de su acoplamiento

en orto con el H₄ y en meta con el H₁. Esta señal se observa con un desplazamiento químico de 7,48 ppm con un área de integración una constante de acoplamiento J=2,62 Hz correspondiente al acoplamiento con H₁ y J=9,68 Hz correspondiente al acoplamiento con H₄. Por otro lado, las señales de los hidrógenos 4, 6 y 9 presentan un desplazamiento químico marcadamente mayor, debido al efecto desapantallante de los grupos *N*-óxido adyacentes. La señal de H₄ es fácilmente reconocible mirando los estudios de HMBC y la constante de acoplamiento con H₃. Esta señal es del tipo doblete con un desplazamiento químico de 8,48 ppm, una constante de acoplamiento J=9,66 Hz y un área de integración igual a 1. La señal de H₆:H₉ es reconocida en base al desplazamiento, multiplicidad y acoplamiento de H₇ y H₈. Esta señal tiene una multiplicidad del tipo multiplete con un desplazamiento químico de 8,54 ppm y un área de integración igual a 2. Finalmente, como era esperable, se observa que los protones H₇ y H₈ son químicamente equivalentes, se corresponden con una señal del tipo multiplete (desdoblamiento debido a la presencia de H₆ y H₉) con un desplazamiento de 7,91 ppm y un área de integración igual a 2.

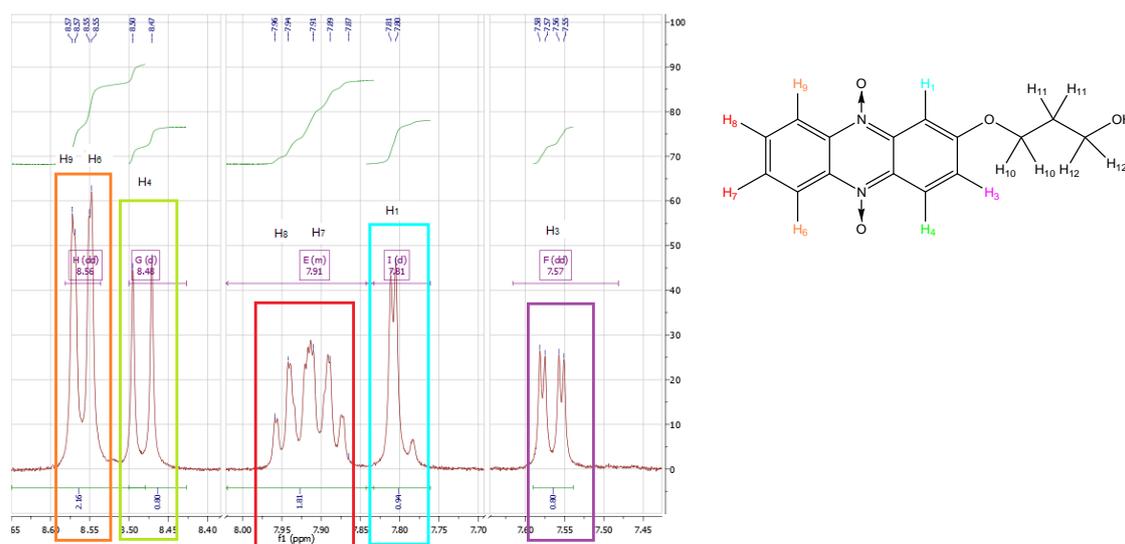


Figura 4.12 - Se muestra la región entre 7.50 y 8.60 ppm del espectro ¹H-RMN del derivado **6** (estructura a la derecha del espectro) procesado con software MestReNova. Disolvente DMSO; temperatura de adquisición 22 °C.

En la figura 4.13 se presenta el espectro de correlación homonuclear (COSY) ^1H - ^1H del derivado **6** de la región correspondiente a los protones aromáticos del heterociclo de fenazina. Este espectro nos permite confirmar la elucidación estructural del compuesto mencionada anteriormente. Los círculos dibujados en el espectro permiten una mejor visualización del acoplamiento escalar protón-protón. A modo de ejemplo, los círculos azules señalan el acoplamiento escalar entre H_3 : H_4 . Los círculos verdes señalan el acoplamiento escalar entre los protones H_3 : H_1 y los círculos rojos señalan el acoplamiento escalar entre los protones H_6 : H_7 .

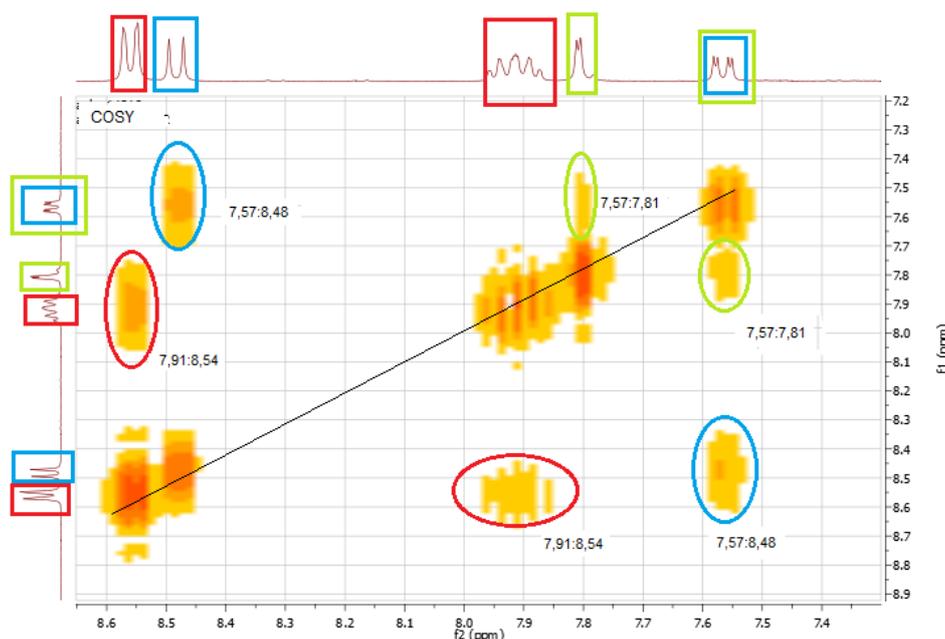


Figura 4.13 - Espectro COSY de de la región aromática del derivado **6**. Los círculos indican el acoplamiento escalar entre núcleos vecinos aromáticos.

En la figura 4.14 se muestra el espectro correspondiente al experimento de correlación heteronuclear HSQC. En este tipo de espectros se puede apreciar claramente la correlación bidimensional de cada tipo de protón con su correspondiente carbono en la molécula (correlación H-C a un enlace). En la actualidad este tipo de experimento se lleva a cabo mediante detección inversa; se detecta la señal del heteronúcleo (^{13}C en este caso en particular) a través del protón que es más sensible y con mayor abundancia isotópica en la muestra (99.98 de ^1H vs 1.11 de ^{13}C), es decir, se excita al heteronúcleo y éste le transmite la magnetización al ^1H y el equipo lo detecta. A modo de ejemplo se muestran en la figura 4.15 la correlación de los protones con sus respectivos carbonos. El círculo verde oscuro se corresponde con la correlación heteronuclear a un enlace del protón H_{11} y el carbono al que está enlazado (32,16 ppm). El círculo amarillo se corresponde con el protón H_{12} y el carbono al

que está enlazado (57,59 ppm). El círculo azul se corresponde con el protón H₁₀ y el carbono al que está enlazado (66,64 ppm). También se puede ver los protones y carbonos aromáticos entre 95 y 135 ppm. El círculo violeta se corresponde con la correlación heteronuclear a un enlace del protón H₃ y el carbono al que está enlazado (125,74 ppm). El círculo turquesa se corresponde con el protón H₁ y el carbono al que está enlazado (97,69 ppm). El círculo verde se corresponde con los protones H₇ y H₈ y los carbonos a los cuales están enlazados (130,95 y 132,03 ppm). El círculo rojo se corresponde con el protón H₄ y el carbono al que está enlazado (121,98 ppm) y finalmente el círculo gris se corresponde con los protones H₆ y H₉ y los carbonos a los cuales están enlazados (119,85 y 120,12 ppm). Si se observa, el protón H₁₃ no se correlaciona con ningún carbono, hecho que confirma que este protón es el correspondiente al grupo alcohol.

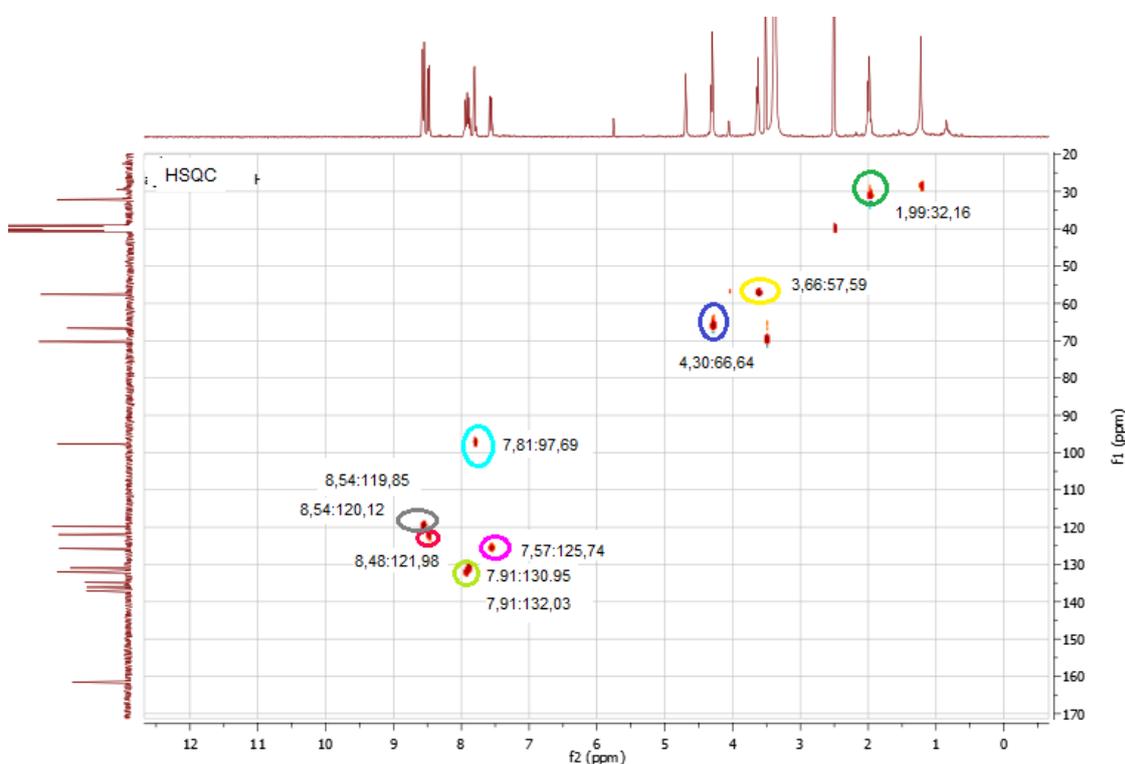


Figura 4.14 - Experimento de HSQC del derivado **6**. Los círculos indican la correlación heteronuclear $^1\text{H}:\text{}^{13}\text{C}$ a un enlace de distancia.

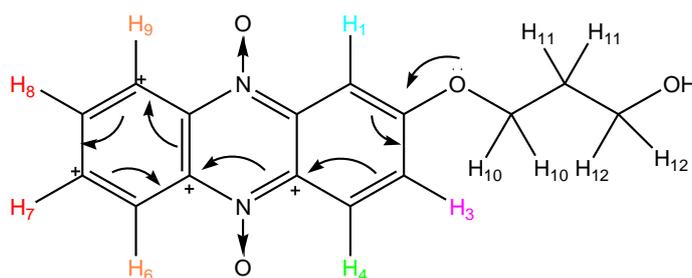


Figura 4.15 - Deslocalización parcial de cargas del derivado **6**.

Para poder identificar que carbono se corresponde con H_6 , H_9 , H_7 y H_8 tuvimos en cuenta la deslocalización parcial de carga que puede presentar la molécula. Como vemos en la figura 4.15 los carbonos que se corresponden con los protones H_7 y H_9 tienen una deslocalización parcial de carga positiva y por lo tanto se espera que el desplazamiento de los carbonos asociados a ellos sea menor. Es por esto que se concluyó que el carbono asociado a H_6 tiene un desplazamiento de 120,12 ppm y el carbono asociado a H_9 tiene un desplazamiento de 119,85 ppm. De la misma manera se concluyó que el carbono asociado a H_8 tiene un desplazamiento de 132,03 ppm y que el carbono asociado a H_7 tiene un desplazamiento de 130,95 ppm.

Para poder identificar los carbonos cuaternarios, se utilizó un método alternativo que consiste en establecer correlaciones entre carbonos y protones vecinos a más de un enlace, llamadas correlaciones a larga distancia o a varios enlaces, y es conocido comúnmente como HMBC. En la figura 4.16 se presenta el espectro de HMBC para el derivado **6**.

Este experimento fue muy útil para lograr elucidar los carbonos cuaternarios del heterociclo de la fenazina. En color verde se representan los protones aromáticos H_3 y H_1 correlacionados con el carbono grupo éter (161,55 ppm) a 2 enlaces de distancia. Para la identificación de los carbonos también fue necesario observar la deslocalización parcial de cargas (figura 4.15) para poder diferenciar entre H_9C-C-N y $N-C-CH_6$ al igual que para $N-C-CH_1$ y H_4C-C-N . En los tres círculos amarillos se representan las correlaciones con el carbono cuaternario del anillo aromático, H_4C-C-N a 132,20 ppm que se ve relacionado con el protón H_4 a dos enlaces de distancia y con los protones H_3 , H_1 a tres enlaces de distancia. Los dos círculos violetas corresponden a la correlación de los protones H_1 y H_4 con el carbono cuaternario aromático $N-C-CH_1$ (137,14 ppm) a dos y tres enlaces de distancia respectivamente. Por último, los dos círculos azules corresponden a la correlación de los protones H_6 , H_7 , H_8 , H_9 con los carbonos aromáticos cuaternarios H_9C-C-N (136,12 ppm) y $N-C-CH_6$ (134,84 ppm). Como se puede ver en

la figura 4.15 los carbonos N-C-CH₆ y H₄C-C-N tienen una deslocalización de carga parcial positiva y es por esto que tienen un desplazamiento químico menor.

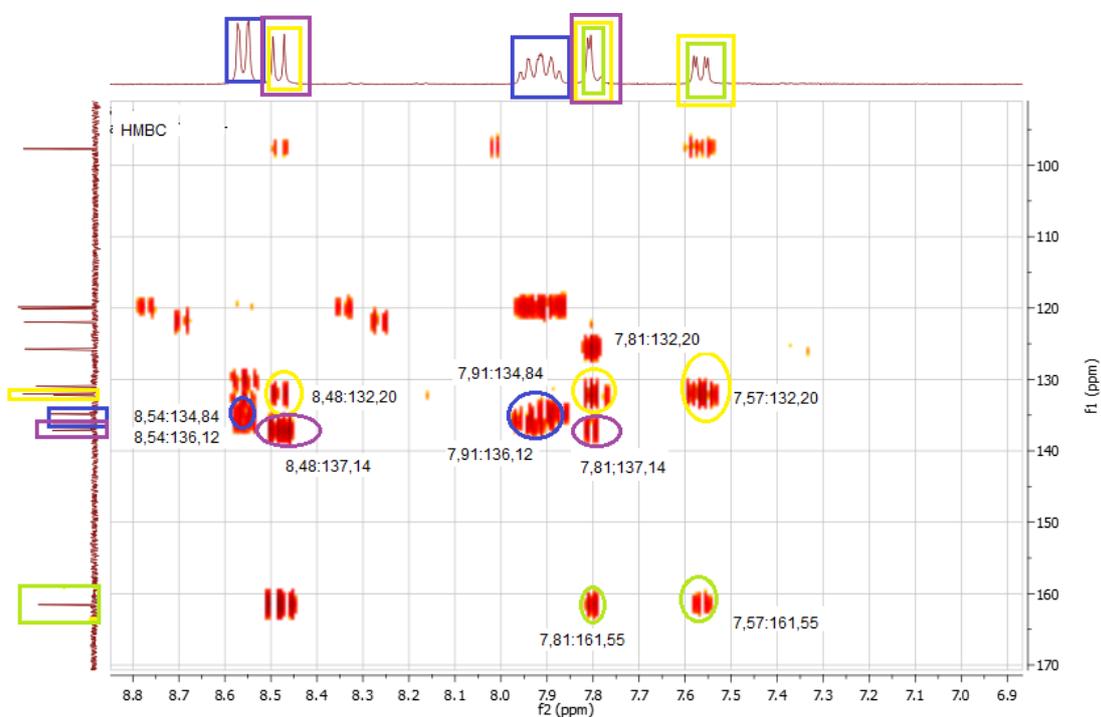


Figura 4.16 - Experimento de HMBC del derivado **6**. Los círculos indican la correlación heteronuclear $^1\text{H}:\text{C}^{13}$ a dos o tres enlaces de distancia.

Por último, para terminar de caracterizar la molécula, en la figura 4.17 se muestra el espectro de masas del derivado **6** obtenido a través de espectrometría de masas de tipo TOF MS ES+. En la figura se observa claramente el pico M+ (286,1) y la pérdida de los oxígenos de los N-óxidos (270,1, 253,1).

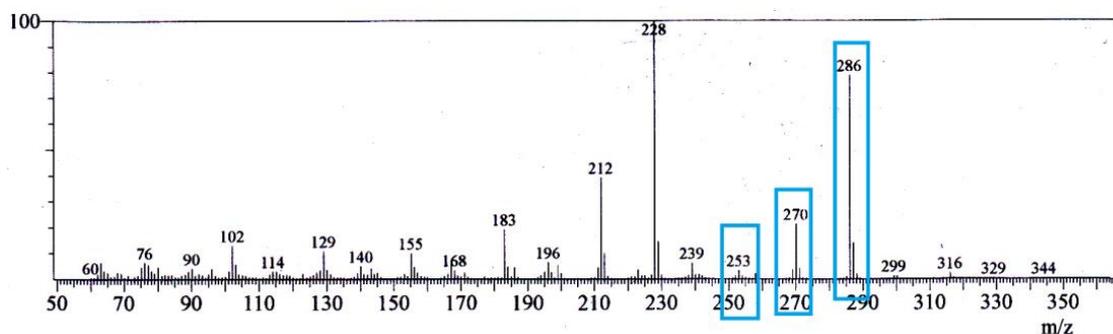


Figura 4.17 - Espectro de masa del derivado **6**.

Como se comentó anteriormente, también fue posible la síntesis del derivado **7**, cuya síntesis fue bajo las mismas condiciones que el derivado **6**. El análisis espectroscópico (^1H -RMN, ^{13}C -RMN) del producto obtenido confirman las estructuras propuestas. Por ^1H -RMN se confirmó la presencia un solo isómero mayoritario (7-isómero), obtenido con un rendimiento de 23%. No se detallará toda la elucidación estructural ya que es muy similar a la del derivado **6**. A modo de comparación con el derivado **6**, se detallará el análisis de la zona del ^1H -RMN correspondiente a los protones presentes en la cadena alifática.

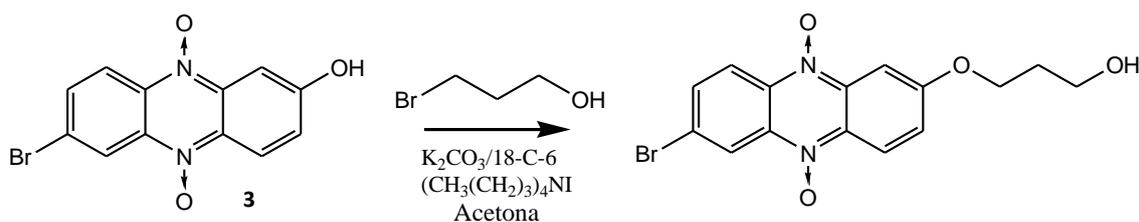


Figura 4.18 - Síntesis de *N*⁵,*N*¹⁰-dióxido de 7-bromo-2-hidroxipropiloxifenazina (**7**).

En la figura 4.19 se puede visualizar la elucidación espectroscópica de los protones correspondientes a la cadena alquílica. En primer lugar, observando el estudio COSY se pudo determinar la señal de los protones H₁₁ (un multiplete a 2,15 ppm), ya que ésta señal está correlacionada con la señal de los protones H₁₀ y H₁₂. También se pudo identificar una señal de tipo triplete con un desplazamiento de 4,39 ppm y una constante de acoplamiento de 6,35 Hz correspondiente a los protones H₁₀. A diferencia del derivado **6**, la señal correspondiente a los protones H₁₂ es una señal del tipo triplete con un desplazamiento químico de 3,83 ppm ya que ésta se encuentra desdoblada únicamente por la presencia de los protones H₁₁. No se observa una señal correspondiente al protón del alcohol. Esto puede ser debido a la presencia del bromo que esté interaccionando con el protón del hidroxilo de forma que no ocurra desdoblamiento o a que el protón esté interaccionando con el disolvente utilizado en este caso para realizar la espectroscopía (MeOD).

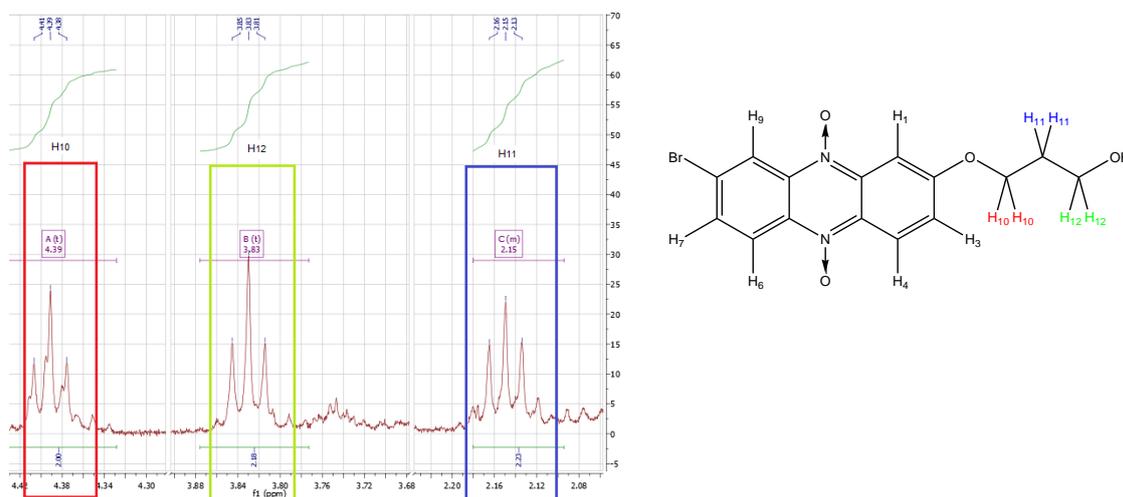


Figura 4.19- Se muestra la región entre 1.90 y 4.40 ppm del espectro ¹H-RMN de N⁵,N¹⁰-dióxido de 7-bromo-2-hidroxiopropiloxifenazina (derivado **7**, estructura a la derecha del espectro) procesado con software MestReNova. Disolvente MeOD; temperatura de adquisición 22 °C.

4.1.5 Desprotección N^5, N^{10} -dióxido de 2-ftalimidilpropiloxifenazina (**5**)

Se intentó la desprotección del derivado **5** con el fin de sintetizar una molécula con un grupo amino libre, capaz de interactuar con el ADN. Se probaron varias condiciones pero no se logró obtener el producto deseado.

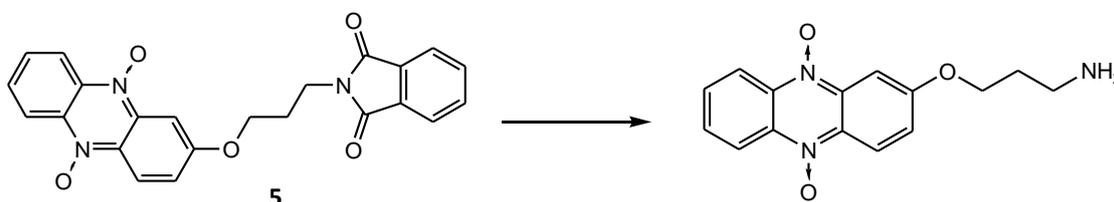


Figura 4.20 - Síntesis general para la desprotección del derivado **5**.

Condiciones	Resultado
CH₃NH₂/Acetona T. ambiente, 7 hrs.⁷	Luego de transcurridas 2 horas de reacción se comienza a observar 2 productos. Se aíslan ambos productos y se realiza ¹ H-RMN.
CH₃NH₂.HCl barboteo/DCM T. ambiente, 24 hrs.	Se observa descomposición y la aparición de varios productos secundarios.
HBr, Reflujo 80 hrs	A las 24 horas de reflujo se observa la aparición de dos productos. Se realizó ¹ H-RMN y los experimentos de COSY, HSQC y HMBC.
2H₂NH₂ .2H₂O/DCM T. ambiente, 120 hrs.	Luego de las 48 horas se comienza a ver un producto pero no se pudo aislar dicho producto.

Tabla 4.2 - Condiciones de reacción ensayadas para la desprotección del derivado **5**.

Como se observa en la tabla 4.2, primero se intentaron condiciones suaves con CH₃NH₂ que no implicaran reflujo para evitar la pérdida de los *N*-óxidos. Además se quería evitar utilizar hidracina ya que ha sido descrito como un posible reductor de *N*-óxidos. En todos los productos aislados y analizados por ¹H-RMN se observó la presencia de las señales de los protones aromáticos correspondientes a la N^5, N^{10} -dióxido de 2-ftalimidilpropiloxifenazina.

4.1.6 Bibliografía

- (1) Cerecetto, H.; González, M.; Lavaggi M.L.; Porcal, W. (2005) *“Preparation of phenazine N⁵,N¹⁰-dioxides. Effects of benzofuroxan substituents in the outcome of their expansion reaction with phenolates”*. Journal of the Brazilian Chemical Society. 16, 1290-12296.
- (2) Porcal, W.; Hernández, P.; Boiani, L.; Boiani, M.; Ferreira, A.; Chidichimo, A.; Cazzulo, J.J.; Olea-Azar, C.; González, M.; Cerecetto, H. (2008) *“New trypanocidal hybrid compounds from the association of hydrazone moieties and benzofuroxan heterocycle”*. Bioorganic and Medicinal Chemistry.15; 6995-7004.
- (3) Ludwig, G.-W.; Baumgartel, H. (1982) *“Isomerengildung bei der benzofurazan N-oxide mit fenolaten”*. Chemical Bericht. 115, 2380-2382.
- (4) Lavaggi, M.L.; Nieves, M.; Cabrera, M.; Olea-Azar, C.; López de Cerain, A.; Monge, A.; Cerecetto, H.; González, M. (2010) *“Structural modifications on the phenazine N,N'-dioxide-scaffold looking for new selective hypoxic cytotoxins”*. European Journal of Medicinal Chemistry, 45, 5362-5369.
- (5) McMurry, J. (2004) *“Química Orgánica”*. Pag. 354. 4ta. Ed. Mexico. Thomson.
- (6) <http://www.quimicaorganica.net/disolvente-sn2.html> (acceso, 27 Junio 2013)
- (7) López, GV.; Blanco, F.; Hernández, P.; Ferreira, A.; Piro, OE.; Batthyany, C.; González, M.; Rubbo, H.; Cerecetto, H. (2007) *“Second generation of α -tocopherol analogs-nitric oxide donors: Synthesis, physicochemical, and biological characterization”*. Bioorganic and Medicinal Chemistry. 15, 6262-6272.

4.2 Evaluación biológica

4.2.1 Estudio de interacción DNA- compuesto por espectroscopia de fluorescencia

Como se mencionó anteriormente en la sección de antecedentes (sección 2.1), el método de espectroscopía de fluorescencia puede ser utilizado para determinar el grado de afinidad de un compuesto con el ADN.

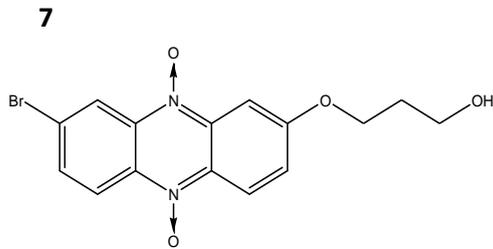
El heterociclo de fenazina es un fuerte fluoróforo, tanto por la predominante deslocalización electrónica, como por la presencia de heteroátomos en el anillo. Si se lo excita con radiación dentro del rango UV-visible, este irradia fotones con mayores longitudes de onda, es decir, con menor energía. Cuando una molécula absorbe un fotón, pasa a un estado energético excitado luego de lo cual puede volver al estado basal por diferentes vías. Entre las distintas vías de desactivación se encuentran la fluorescencia. En dicho marco, el agregado de una segunda molécula denominada desactivador o *quencher* funciona como una vía adicional no radiativa para la desactivación de la molécula excitada. La molécula del desactivador forma un complejo con el fluoróforo, modificando sus características electrónicas. Esto permite que el retorno al estado basal tenga lugar sin emisión de fluorescencia¹. Cuando un fluoróforo interacciona con el ADN se produce un fenómeno desactivación denominado *quenching*. Gracias a este fenómeno, es posible estudiar el grado de interacción con el ADN de los compuestos midiendo la intensidad de fluorescencia de estos en presencia de diferentes concentraciones de ADN. Se utiliza como control positivo azul de toluidina (TB), que es reconocido como un agente intercalante además de tener interacciones electrostáticas con el ADN².

En una primera instancia se debe definir la longitud de onda a la que se irradiará el compuesto. Para esto se estudia el espectro de absorción del mismo y se elige el rango de longitudes de onda donde se observa máxima absorción. Posteriormente se incubó el compuesto, en una concentración 20µM, con una serie de concentraciones de ADN de timo de ternera de alta pureza, que van desde 0 a 400 µM. La incubación se desarrolla durante 30 minutos, a 37°C, en buffer de fosfato pH=6 que simula las condiciones ácidas del entorno e interior de una célula tumoral hipóxica³. Luego de la incubación, la muestra se irradia con la longitud de onda anteriormente definida y se registra su espectro de emisión (figura 5.1).

Al graficar la I_f a dicha longitud de onda en función de la concentración de ADN, el fenómeno de desactivación se evidenciaría con la obtención de un gráfico de saturación (figura 5.2).

Luego, para determinar el grado de afinidad con ADN de cada compuesto, se recurre al

análisis de Stern-Volmer^{1,4}. La ecuación de Stern-Volmer se aplica sobre los primeros puntos del gráfico, donde aún no se observa el fenómeno de saturación. La pendiente del gráfico I_f/I_{fADN} vs. $[ADN]$ se denomina constante de Stern- Volmer (K_{sv}) y está directamente relacionada con la afinidad del compuesto por ADN (figura 5.3).



Mediante el espectro de absorción se determina la longitud de onda máxima que es de 550 nm.

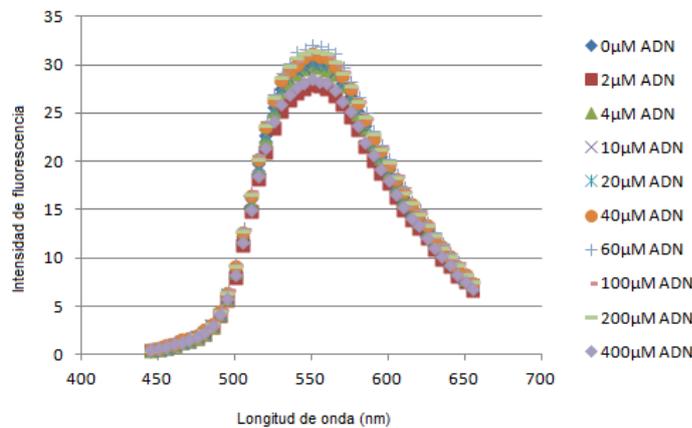


Figura 5.1- Espectro de emisión de fluorescencia del derivado **7**.

La figura 5.1 muestra el espectro de emisión de fluorescencia del derivado **7**. No se observa un descenso en la intensidad de fluorescencia (I_f) a medida que se incrementa la concentración de ADN, lo que indica que el compuesto no estaría interactuando con el ADN. A partir del espectro de emisión es posible determinar la longitud de onda máxima de emisión. Al graficar la I_f a dicha longitud de onda en función de la concentración de ADN, si el compuesto interactúa con el ADN se obtiene un gráfico de saturación que permite visualizar claramente el fenómeno de desactivación. Como se observa en la figura 5.2, no se obtiene un gráfico de saturación por lo que se puede concluir que el derivado **5** no presenta ninguna interacción con el ADN observable por este método.

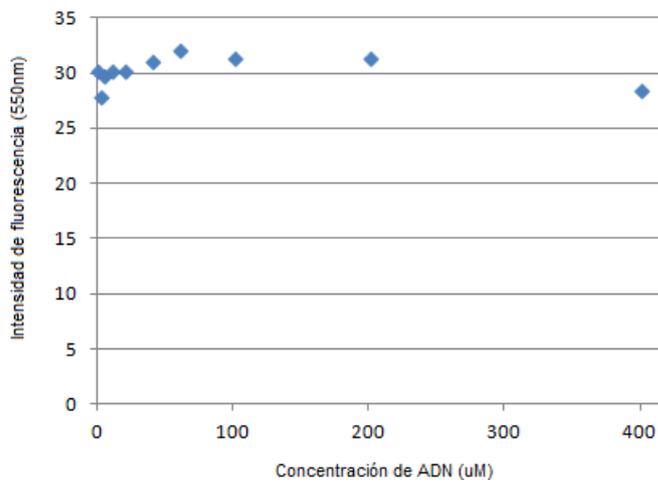


Figura 5.2 - Gráfico de intensidad de fluorescencia a la longitud de onda de máxima emisión en función de la concentración de ADN para el derivado 7.

A pesar de que no se observó un gráfico de saturación a partir del gráfico de intensidad de fluorescencia máxima en función de la concentración de ADN, se realizó el gráfico de Stern-Volmer para poder calcular la constante Ksv.

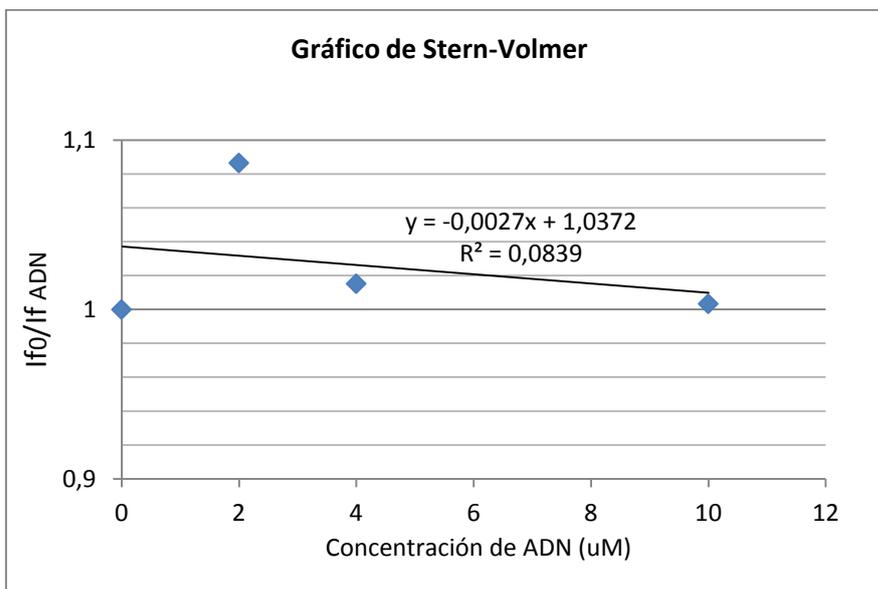


Figura 5.3 – Gráfico de Stern-Volmer cuya pendiente corresponde a Ksv del derivado 7.

A partir del gráfico de Stern-Volmer se pudo calcular la Ksv correspondiente al derivado 7, que tiene un valor de $(2,7 \pm 0,8) \times 10^{-3}$. El mismo análisis fue realizado para el derivado 5 cuya pendiente Ksv tiene un valor de $(1,5 \pm 1,3) \times 10^{-3}$. Ambos derivados presentaron un comportamiento parecido, ninguno de los dos presenta una interacción con el ADN que se

vea reflejada en una disminución de la fluorescencia del mismo. En la siguiente sección se evaluará por el método de electroforesis y se observará si estos derivados presentan otro tipo de interacción con ADN.

Debido a los bajos rendimientos obtenidos en la repetición de la síntesis del derivado **6** por problemas en la purificación, no fue posible obtener suficiente producto para evaluar el compuesto bajo el método de fluorescencia.

4.2.2 Estudio de interacción DNA- compuesto por electroforesis

Los ensayos con plásmido superenrollado son muy útiles para caracterizar la interacción de compuestos con ADN. Esto se debe a que en condiciones normales, el plásmido puede tener tres conformaciones predominantes: una conformación superenrollada, de mayor movilidad; una conformación lineal de menor movilidad, debida a la ruptura mecánica u de otro origen en ambas cadenas; y una conformación circular de menor movilidad aún, la cual se genera por un corte en solamente una de las cadenas. Por lo tanto, en el caso de que la interacción con el compuesto genere un corte en la molécula de ADN, es de esperar un aumento en la intensidad de las bandas correspondientes a la forma circular y lineal y una disminución en la correspondiente a la forma superenrollado. Sin embargo, también puede ocurrir otro tipo de interacción no covalente con el ADN, como ser la intercalación y o la interacción con el surco menor y que la misma no genere cortes como producto final. En este tipo de interacción el compuesto introduce modificaciones conformacionales en el ADN, como la reducción de supervueltas negativas en su estructura terciaria o la formación de codos, las cuales afectan la movilidad del plásmido en el gel. El patrón electroforético generado por este tipo de interacciones puede ser similar al de un corte, aunque es frecuente que se observe un perfil mucho más difuso ya que se generan una gran variedad de estructuras intermediarias^{5,6}.

En este estudio, el ADN plasmídico, obtenido y purificado mediante técnicas estándar (sección 8), es incubado en presencia de los compuestos por 24 h a 37 °C. Terminada la incubación, la reacción se detiene y todas las muestras se someten a una electroforesis en gel de agarosa en ausencia de agentes intercalantes. El gel se tiñe con bromuro de etidio y la movilidad relativa de las bandas de ADN se visualiza por luz UV. Todos los compuestos utilizados tienen una baja solubilidad en solución acuosa, por lo que las disoluciones de los mismos deben realizarse en 100 % DMSO. Según se describió previamente el DMSO, por sí mismo, no tendría efecto apreciable sobre el ADN plasmídico en incubaciones a 37°C por 24hs, en concentraciones menores o iguales al 50%⁷. Contrariamente con esto, al incubar el ADN plasmídico en presencia de concentraciones crecientes de DMSO se observó un cambio

en el perfil electroforético del plásmido dependiente de la concentración del *scavenger* de electrones.

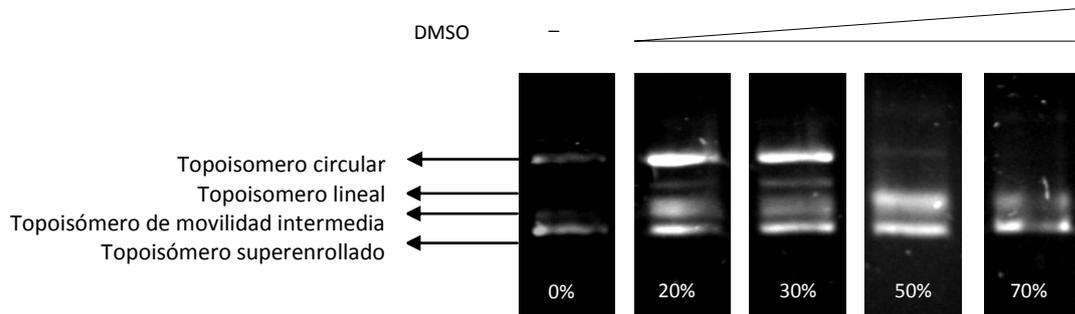


Figura 5.1 - Efecto en la conformación del ADN al agregar concentraciones crecientes de DMSO. Se incubaron 300 ng de plásmido KS II BlueScript en *buffer* Tris-HCl, agregando concentraciones crecientes de DMSO.

En la figura 5.1 se observa claramente que el DMSO utilizado, tiene un alto impacto sobre el ADN. Se puede ver la aparición de la forma lineal del ADN, además de la aparición de un topoisómero con movilidad intermedia entre la forma lineal y la superenrollada del plásmido, con la concomitante desaparición de la forma circular y superenrollada del ADN. Teniendo en cuenta este resultado es que independientemente de la concentración de compuesto agregado al ensayo, para cada caso se conservó la cantidad de DMSO agregado, de manera de permitir la visualización de un efecto dependiente de la concentración de compuesto. Teniendo en cuenta estos resultados, se decidió evaluar que efecto tiene el agregado del compuesto sobre el efecto del DMSO y principalmente analizar el efecto del compuesto sobre el ADN al aumentar el ri.

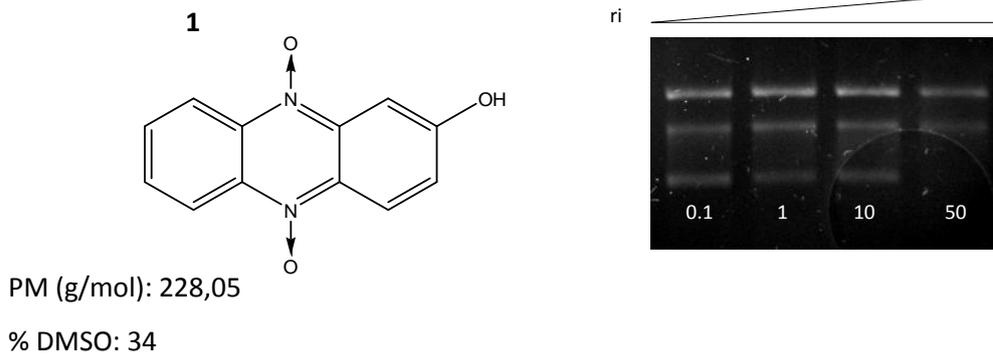


Figura 5.2 - Efecto en la conformación del ADN al agregar concentraciones crecientes del derivado **1**.

En la figura 5.2 se observa que el compuesto produce una degradación gradual de todas las formas del ADN. Se aprecia además (ri 50) la desaparición total del ADN superenrollado y una disminución en la cantidad de las otras dos formas en las que se presenta el plásmido. Se puede concluir que este compuesto tendría un efecto leve sobre el ADN y que dicho efecto parecería ser concentración dependiente.

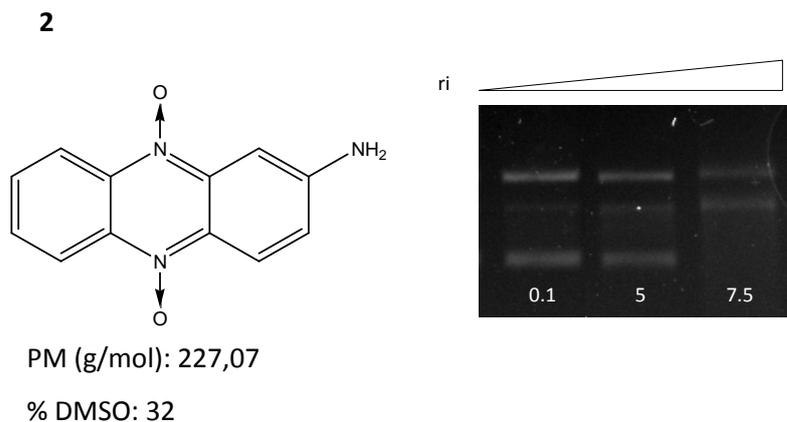


Figura 5.3 - Efecto en la conformación del ADN al agregar concentraciones crecientes del derivado **2**.

Al igual que el compuesto **1**, el compuesto **2** (Figura 5.3) también degrada el ADN plasmídico. Se observa un cambio en la intensidad de las bandas correspondientes a las formas superenrollada, circular y lineal, lo que se refleja en la cantidad de una u otra forma presente al finalizar la incubación. Sin embargo, el efecto es visiblemente mayor que el observado para el compuesto **1**, ya que se hace evidente a un menor ri.

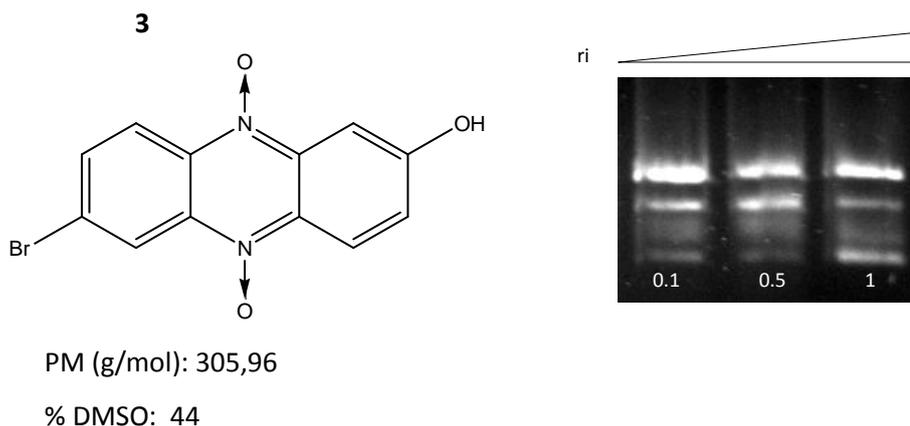


Figura 5.4 - Efecto en la conformación del ADN al agregar concentraciones crecientes del derivado **3**.

El ADN plasmídico incubado en presencia del compuesto **3** (figura 5.4) parece no alterar el perfil observado para el mismo plásmido en presencia de DMSO. En el gel se aprecian las bandas correspondientes a los topoisómeros descritos en la figura 5.1.

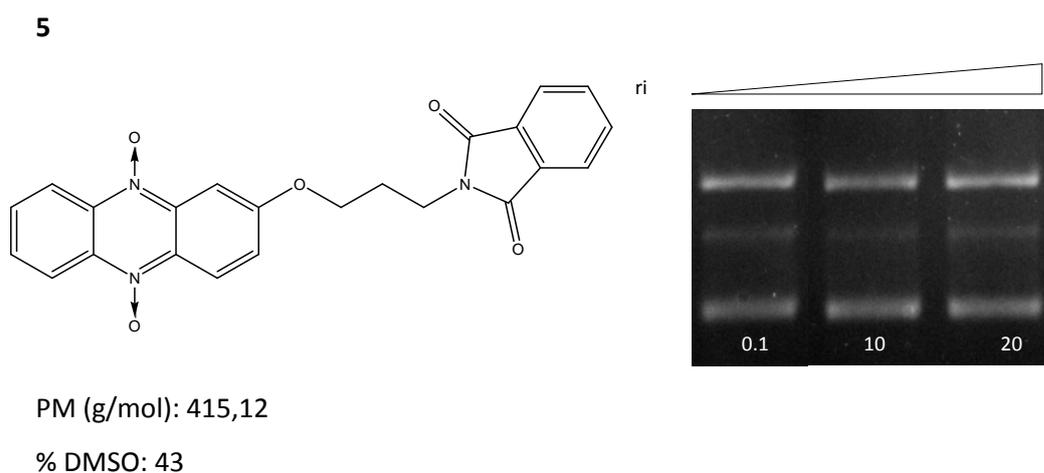


Figura 5.5 - Efecto en la conformación del ADN al agregar concentraciones crecientes del derivado **5**.

En presencia del compuesto **5** (figura 5.5) no es evidente la presencia del topoisómero de movilidad intermedia observado en los controles con DMSO. Además, en este caso no se ve que existan cambios significativos en las formas del ADN a medida que aumenta el ri. Si comparamos este derivado con su precursor (derivado **1**) vemos que la sustitución con el grupo 3-bromo-*N*-propilftalimida no potencia el efecto del compuesto sobre el ADN.

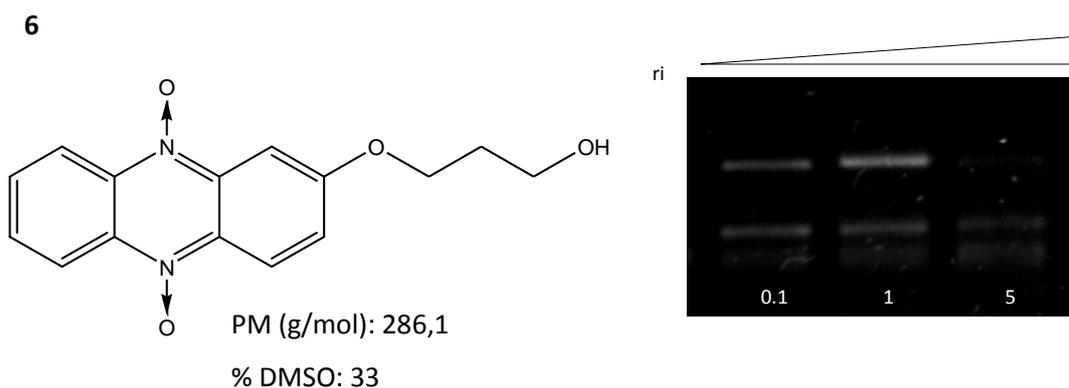


Figura 5.6 - Efecto en la conformación del ADN al agregar concentraciones crecientes del derivado **6**.

Luego de la incubación con el compuesto **6** (figura 5.6), la banda correspondiente al plásmido superenrollado se hace más difusa. Además se observa un aumento en la intensidad de la isoforma circular, posiblemente debida a la generación de una mella en el plásmido superenrollado, que finalmente parece ser completamente degradada. Se observa también la aparición del topoisómero de movilidad intermedia y lineal. Al comparar éste derivado con el derivado **1**, se observa que la sustitución con la cadena 3-bromopropanol podría estar potenciando la capacidad de la molécula de realizar cortes sobre el ADN.

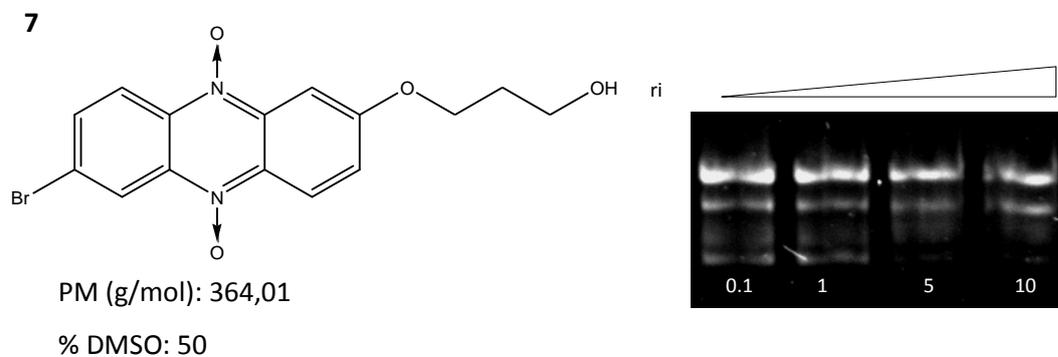
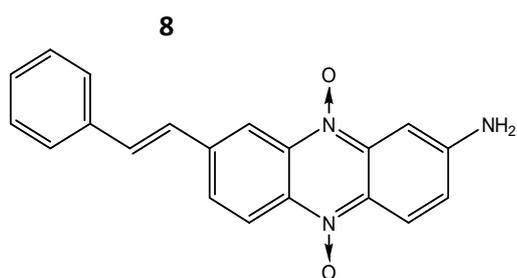


Figura 5.7 - Efecto en la conformación del ADN al agregar concentraciones crecientes del derivado **7**.

En la figura 5.7 se puede observar la disminución del ADN superenrollado a medida que aumenta el ri, hasta casi lograr su total desaparición. Se observa además una disminución del topoisómero de movilidad intermedia con un concomitante aumento de la forma lineal. Nuevamente, si se compara este resultado con el obtenido para el derivado **3**, se puede concluir que la sustitución nucleofílica realizada con 3-bromopropanol aumentaría la capacidad de la molécula de introducir cortes en el ADN.



PM (g/mol): 329,35

% DMSO: 42

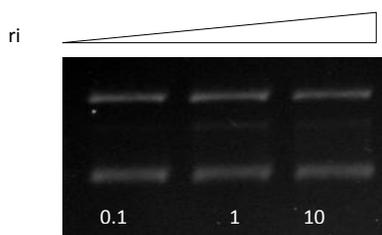
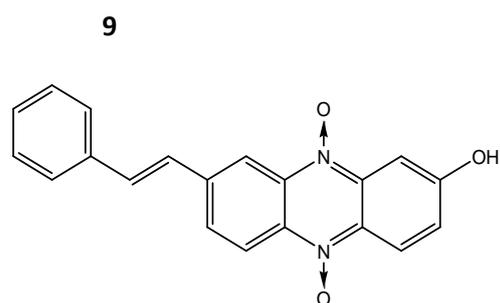


Figura 5.8 - Efecto en la conformación del ADN al agregar concentraciones crecientes del derivado **8**.



PM (g/mol): 330,34

% DMSO: 42

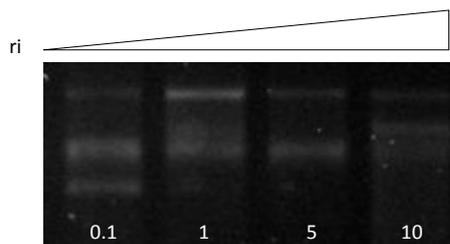


Figura 5.9 - Efecto en la conformación del ADN al agregar concentraciones crecientes del derivado **9**.

Como se observa en la figura 5.8, el derivado **8** tiene un leve efecto de corte sobre el ADN dependiente de la concentración de compuesto, ya que al aumentar el ri se observa una ligera aparición de la forma lineal. Comparando este resultado con el efecto observado para el derivado **2** se puede concluir que la sustitución no produce un cambio importante sobre el patrón de las bandas obtenidas, y presenta incluso un efecto ligeramente menor. Como resultado de la incubación con el compuesto **9**, en la figura 5.9 se puede ver una desaparición tanto de la banda superenrollada como de la banda del topoisómero de movilidad intermedia con una concomitante aparición de la forma lineal. Comparando este resultado con el patrón obtenido para el derivado **1** es apreciable que el agregado de este sustituyente potencia el efecto del compuesto sobre el ADN.

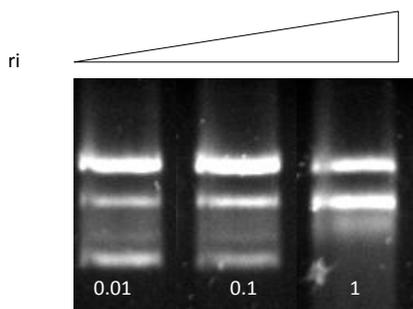
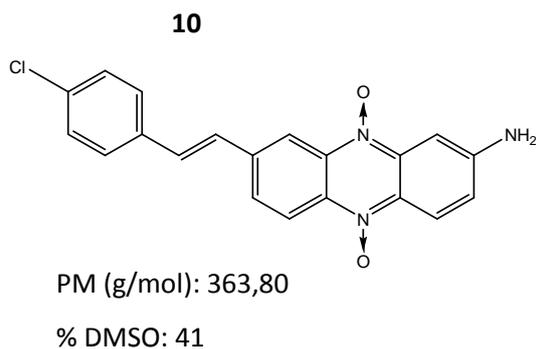


Figura 5.10 - Efecto en la conformación del ADN al agregar concentraciones crecientes del derivado **10**.

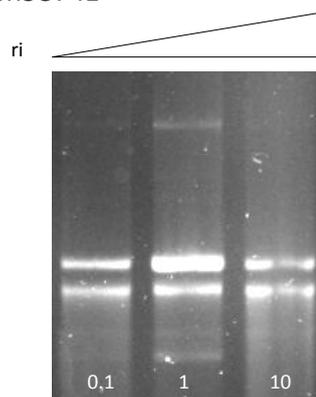
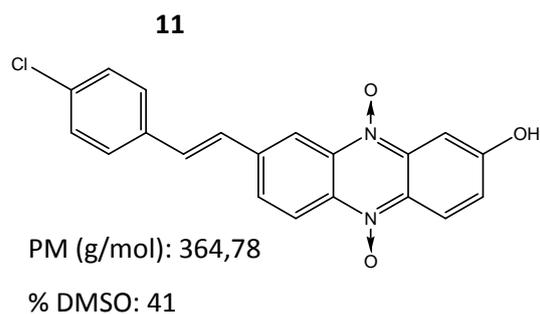


Figura 5.11 - Efecto en la conformación del ADN al agregar concentraciones crecientes del derivado **11**.

El derivado **10** produce degradación de todas las formas del ADN evidenciado por el patrón de degradación continua (figura 5.10). Además se observa que este compuesto produce cortes sobre el ADN. Este efecto es claro debido a la creciente aparición de la banda correspondiente a la forma lineal además de la desaparición de la forma superenrollada del plásmido. Comparando este resultado con el efecto producido por el derivado **2**, se puede concluir que el aumento en el efecto del compuesto sobre el ADN podría deberse a la sustitución sobre el heterociclo de fenazina. En la figura 5.11 se observa que la incubación con el compuesto **11** promueve la desaparición del concatémero que evidenciaría un efecto del compuesto sobre el ADN, concentración dependiente. Debido a la siembra no uniforme de las distintas muestras las bandas correspondientes al ri de **1** se observan en mayor proporción. También se puede ver que el compuesto produce un patrón de degradación continua sobre el ADN.

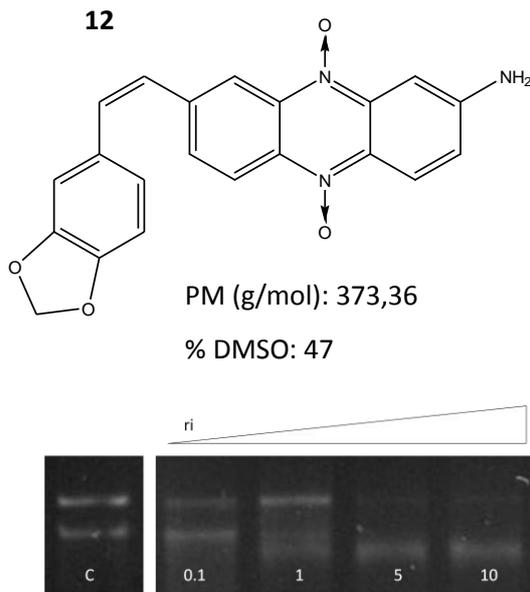


Figura 5.12 - Efecto en la conformación del ADN al agregar concentraciones crecientes del derivado **12**.

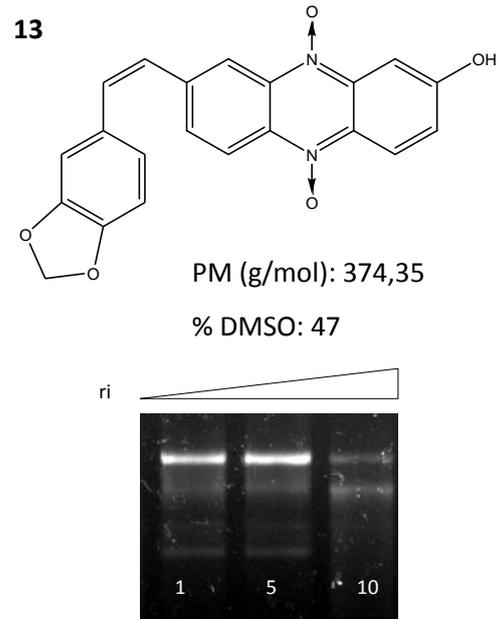


Figura 5.13 - Efecto en la conformación del ADN al agregar concentraciones crecientes del derivado **13**.

Para el análisis de este derivado, se compararon los resultados con el control en ausencia de DMSO, ya que como se observa en la figura 5.12, la banda correspondiente al topoisómero superenrollado no está presente. Se observa la disminución en la intensidad de la banda correspondiente al ADN circular además de la desaparición del ADN lineal y la aparición del topoisómero de alta migración. Se puede concluir que el derivado produce degradación. Este resultado da la idea de que el compuesto interactúe preferentemente con la forma lineal, probablemente actuando a través de los extremos. En la figura 5.13 también se observa degradación de todas las formas de ADN. Además, se puede ver que el derivado genera cortes sobre el ADN ya que es apreciable que a medida que se da la disminución en la intensidad de la banda correspondiente al ADN superenrollado, junto con una disminución del ADN circular, se da el aumento de la forma lineal.

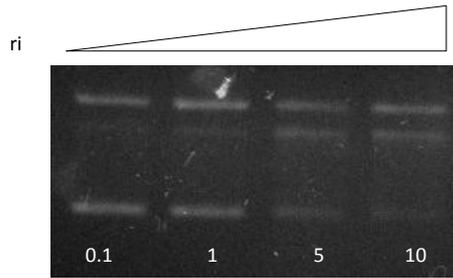
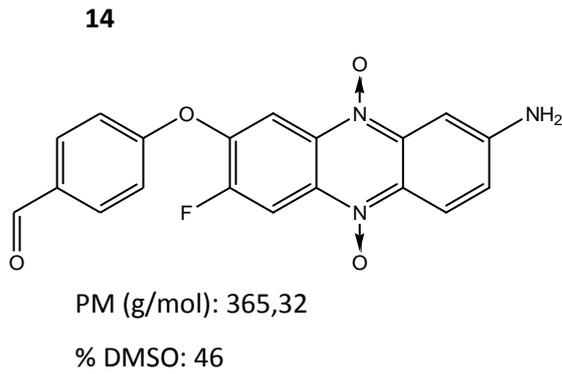


Figura 5.14 - Efecto en la conformación del ADN al agregar concentraciones crecientes del derivado **14**.

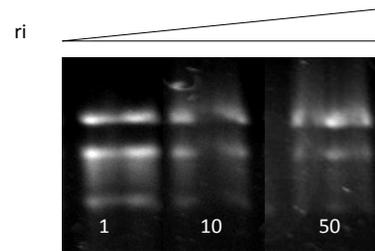
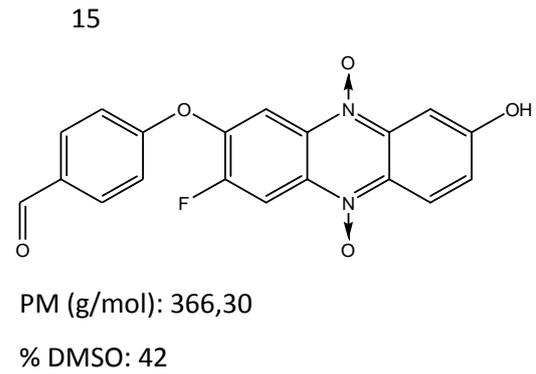


Figura 5.15 - Efecto en la conformación del ADN al agregar concentraciones crecientes del derivado **15**.

En la figura 5.14 se puede ver que el derivado **14** presenta un leve efecto de corte, concentración dependiente, sobre el ADN ya que se observa una ligera desaparición del ADN superenrollado con una concomitante aparición del ADN lineal.

Como se observa en la figura 5.15, el derivado **15** produce degradación gradual de todas las formas del ADN sin visualizarse preferencia por alguna de las isoformas.

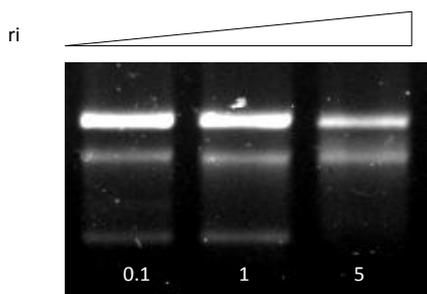
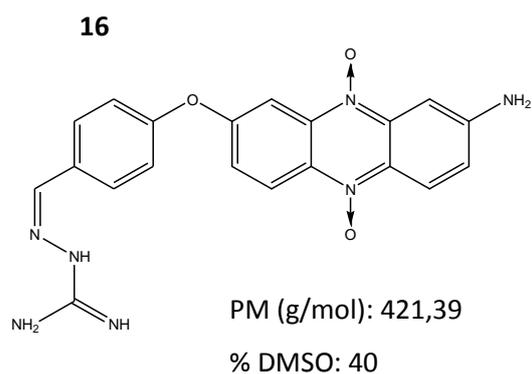


Figura 5.16 - Efecto en la conformación del ADN al agregar concentraciones crecientes del derivado **16**.

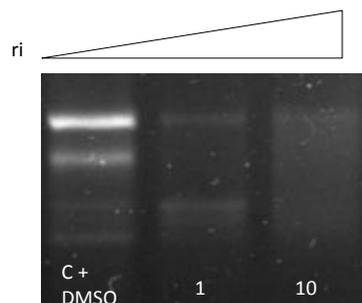
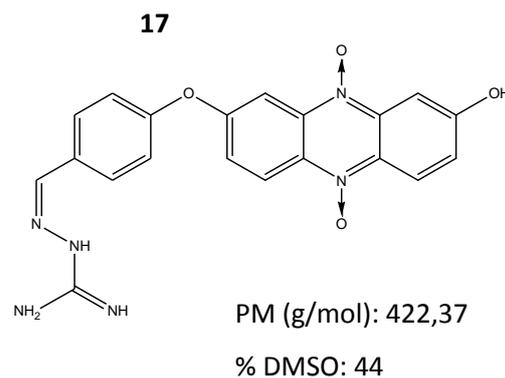


Figura 5.17 - Efecto en la conformación del ADN al agregar concentraciones crecientes del derivado **17**.

Como se aprecia en la figura 5.16, el derivado **16** también genera degradación de todas las formas del ADN resultando evidente la desaparición gradual del ADN superenrollado. El derivado **17** tiene un potente efecto de degradación sobre el ADN plasmídico evidenciado por la desaparición total de las bandas correspondientes a los distintos topoisómeros de ADN (figura 5.17).

En resumen, aunque el efecto que en nuestro caso se observa con el solvente dificulta la interpretación, se puede concluir que el principal mecanismo de acción de los compuestos ensayados es la introducción de cortes en las cadenas de ADN. En algunos casos, esta degradación lleva a la aparición o enriquecimiento de las formas circular y/o lineal, llegando a la degradación masiva para los ri altos. Llama la atención el hecho de que la incubación con algunos compuestos previene la formación de los topoisómeros de migración mayor a la forma lineal.

Se observa que la presencia del grupo amino en la posición 2 (compuesto **2**) promueve un efecto mayor sobre el ADN en comparación con el grupo hidroxilo del (compuesto **1**). También se pudo observar que el sustituyente fenietenil potencia la actividad en el derivado 2-hidroxi (compuesto **9**) aunque no en forma tan notoria en el derivado 2-amino (compuesto

8), que ya tiene, en sí mismo, la capacidad de degradar en forma muy marcada al ADN. De la misma manera, para el sustituyente 4-formilfenoxi, al comparar la pareja **1 - 15** se observó claramente que la presencia tiene un efecto potenciador mientras que el efecto no es notorio para la pareja con el grupo amino en la posición 2 (**2 – 14**).

Si se comparan los resultados con los derivados **1 y 3**, se observa que los derivados *O*-sustituidos como demuestran los derivados hidroxialquílicos **6 y 7**, conducen a potenciar la interacción con ADN. Por otro lado, tomando en cuenta que los resultados de espectroscopia de fluorescencia, indicaban que los derivados **6 y 7** carecían de interacción con ADN, estos compuestos únicamente producirían cortes y degradación del ADN. Esto podría indicar que la incorporación de cadenas hidroxialquílicas conduce a la generación de profármacos interactuantes con ADN.

Con respecto a los derivados sustituidos hacia el oeste de la molécula (**8-17**), derivados de los compuestos **1 y 2**, en todos los casos, se puede concluir que la presencia de los sustituyentes potencian la capacidad de las moléculas de interactuar con ADN.

Con respecto a los derivados de ariletetilfenazina, **10, 11, 12 y 13** se puede decir que el fenilo sustituido le aporta a la molécula una mayor capacidad de producir degradación sobre el ADN, con respecto a los derivados de feniletetilfenazina **8 y 9**. Si se compara este resultado, con los estudios de fluorescencia teniendo en cuenta las *K_{sv}* calculadas, se puede decir que los derivados **8 y 9** presentan además una fuerte interacción de tipo electrostática con el ADN ya que tienen valores de la constante marcadamente elevados, mientras que los derivados **10, 11, 12 y 13**, aunque presentan una interacción del mismo tipo, actúan más fuertemente produciendo degradación sobre el ADN.

Por otro lado comparando los derivados de 4-fenoxifenazina (**14-15**) con los derivados de 4-aminoguanidonilfenoxifenazina **16 y 17**, se observa el efecto de la cadena de aminoguanidona potencia capacidad de degradación sobre el ADN. En este caso se observa el efecto contrario a lo observado en los estudios de fluorescencia. En el mismo, los derivados **14 y 15** presentaron interacción con ADN, al contrario de los derivados **16 y 17**.

La mayoría de los derivados estudiados presentan una preocupante interacción con ADN, ya que esta característica perjudica el diseño racional de los mismos como profármacos selectivos en hipoxia. De esta forma el derivado de N^5, N^{10} -dióxido de 2-hidroxi-fenazina sustituido más promisorio sería el derivado 5.

4.2.3 Bibliografía

- (1) Van Holde, K.E.; Curtis Johnson, W.; Shing Ho, P. (2005) *"Principles of Physical Biochemistry"*. Estados Unidos, Prentice Hall.
- (2) Chi, Z.; Liu, R.; Sun, Y.; Wang, M.; Zhang, P.; Gao, C. (2010) *"Investigation on the toxic interaction of toluidine blue with calf thymus DNA"*. Journal of Hazardous Materials, 175, 274–278.
- (3) Gatenby, R.; Gillies, R. (2004) *"Why do cancer cells have high aerobic glycolysis?"* Nature Reviews in Cancer, 4, 891-899.
- (4) Queiroz, M.; Castanheira, E.; Carvalho, M.; Abreu, A.; Ferreira, P.; Karadeniz, H.; Erdem, A. (2008) *"New tetracyclic heteroaromatic compounds based on dehydroamino acids: photophysical and electrochemical studies of interaction with DNA"*. Tetrahedron, 64, 382-391.
- (5) Cusumano, M.; Di Pietro, M.L.; Giannetto, A. (1999) *"Stacking Surface Effect in the DNA Intercalation of Some Polypyridine Platinum(II) Complexes"*. Inorganic Chemistry. 38, 1754-1758.
- (6) Cusumano, M.; Giannetto, A. (1997) *"The interaction of mixed-ligand square-planar complexes with calf thymus DNA"*. Journal Inorganic Biochemistry. 65, 137-144.
- (7) Guggeri, L. *"Evaluación de complejos de vanadio como potenciales agentes anti-protozarios kinetoplástidos y estudio de si interacción con ADN"*. Tesina de Grado, Universidad de la República.

5. CONCLUSIONES

Se obtuvieron tres nuevos derivados de N^5,N^{10} -dióxido de fenazina, con rendimientos moderados.

Los sustituyentes incorporado hacia el oeste de los derivados **1** y **2** conducen a compuestos que interaccionan con ADN.

Los sustituyentes hidroxialquílicos incorporados hacia el este del derivado **1** conducen a compuestos que interaccionan con ADN.

El sustituyente 4-aminoguanidona presente (**16** y **17**), fue el que causó una mayor degradación del ADN.

De la nueva generación de compuestos, el derivado **5** posee leve interacción con ADN, siendo el derivado más promisorio para futuras modificaciones estructurales y evaluación biológica de sus propiedades bio-reductivas y citotóxicas, así como la interacción de sus derivados reducidos con ADN.

6. PERSPECTIVAS

Para profundizar el estudio aquí presentado consideramos conveniente:

Realizar la evaluación de la citotoxicidad en normoxia-hipoxia de los nuevos derivados sintetizados.

Realizar el estudio de interacción con ADN de los derivados reducidos de los compuestos que presentan menor interacción con ADN, para evaluar la selectividad de los compuestos.

7. MÉTODOS EXPERIMENTALES

7.1 Síntesis y caracterización química

En este apartado se detallan los procedimientos experimentales y el análisis espectroscópico de los productos finales e intermedios obtenidos.

Los disolventes se destilan previo a su uso, por métodos convencionales. Todos los reactivos provienen de fuentes comerciales (Sigma-Aldrich, Janssen, Merck, Fluka, entre otros) y se utilizan sin purificar, excepto que se indique de otra forma.

Los grados de avance de las reacciones y la pureza de los productos se examinan mediante cromatografía en capa fina (CCF). Se utiliza sílicagel con indicador fluorescente sobre placas de poliéster (Alugram® Sil G/UV254) u óxido de aluminio con indicador fluorescente sobre placas de poliéster (Poligram® Alox N/UV254). Las fases móviles utilizadas han sido mezclas en distintas proporciones de AE:EP, CH₂Cl₂:MeOH y CH₂Cl₂:EP.

Los cromatogramas se revelan por alguno de los siguientes métodos:

- Exposición a luz UV (254 nm).
- Exposición a vapores de I₂.
- Asperjado con una mezcla de EtOH:H₂SO₄:anisaldehído (95:4:1) y posterior quemado.
- Asperjado con reactivo de Brady.

Para las columnas cromatográficas, se utiliza sílicagel (Merck, 60–230 mesh) o alúmina (Merck, 70-230 mesh) como soporte sólido y disolventes adecuados como fase móvil.

Los espectros de ¹H-RMN y ¹³C-RMN se realizan en un equipo BRUKER DPX-400 (400 MHz), empleando los disolventes especificados en cada caso y TMS como referencia interna.

Los valores de desplazamiento químico son descritos en unidades de δ (ppm), las multiplicidades se designan como: singulete (s), doblete (d), triplete (t), cuarteto (c), multiplete (m), señal ancha (sa) y las constantes de acoplamiento (J) se expresan en hercios (Hz). En el caso de los espectros de ¹³C-RMN realizados en CDCl₃ el pico central del triplete de CDCl₃ se asigna como 77,0 ppm. Las asignaciones de H y C se realizan en base a experimentos de correlación en 2D-RMN (COSY, HSQC y HMBC). Para los experimentos de COSY, HMBC y HSQC se utilizaron las secuencias de pulsos disponibles en el software del equipo.

La espectrometría de masas fue realizada utilizando equipos LC/MSD-Serie 100 Hewlett-Packard con el método de Ionización por Electrospray (IES-EM), equipo Shimadzu QP-2010 mediante impacto electrónico (IE-EM).

7.1.1 Preparación de derivados de 1-óxido de benzo[1,2-c]1,2,5-oxadiazol (a-c)¹⁻³

Se añade la 2-nitroanilina correspondiente (7,41 mmol) a una mezcla de hidróxido de sodio (7,41mmol) en etanol (6 mL). Se agita la suspensión durante 5 minutos, se enfría en baño de hielo y se añade una solución de hipoclorito de sodio (14,8 mmol). El sólido obtenido se filtra y se lava con abundante agua. El sólido resultante es filtrado y secado a vacío a 20 °C.

7.1.2 Preparación de derivados de N^5,N^{10} -dióxido de 2-aminofenazina (2)⁴⁻⁵

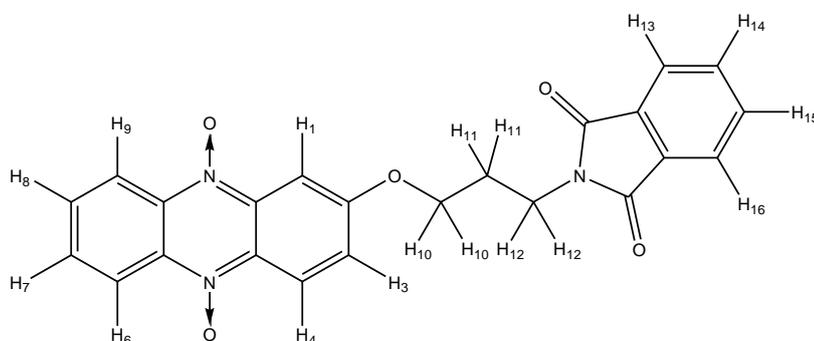
Bajo atmósfera de nitrógeno, se prepara metóxido de sodio disolviendo 3,9 mmol de sodio en 25 mL de metanol anhidro, en baño de hielo a -5 °C. Por otro lado, se disuelve en 5 mL de metanol anhidro y 30 mL tetrahidrofurano anhidro, 20 mmol del 1-óxido de benzo[1,2-c]1,2,5-oxadiazol correspondiente y 20 mmol de *p*-aminofenol, en baño de hielo a -5 °C bajo atmósfera de nitrógeno. La mezcla anterior se vuelca lentamente sobre la solución de metóxido de sodio a -5 °C. Se agita a temperatura ambiente durante 24 horas y posteriormente se refrigera a -20 °C por otras 24 horas. El sólido resultante se filtra y se lava exhaustivamente con hexano, THF, éter etílico hasta obtener un sólido cristalino.

7.1.3 Preparación de derivados de N^5,N^{10} -dióxido de 2-hidroxifenazina (1, 3, 4)⁴⁻⁵

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 °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*-hidroquinona, 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 °C. Se agita a temperatura ambiente durante 24 horas y posteriormente se refrigera a -20 °C por otras 24 horas. El sólido resultante se filtra y se lava exhaustivamente con hexano, THF, éter etílico hasta obtener un sólido cristalino.

7.1.4 Síntesis de N^5,N^{10} -dióxido de 2-ftalimidilpropiloxifenazina (5)

En un balón de 50 mL bajo atmósfera de nitrógeno se disuelven 0,239 mmol de N^5,N^{10} - dióxido de 2-hidroxifenazina en 15 mL de acetona. Luego se agrega 3-bromo-*N*-propilftalimida (0,441 mmol), carbonato de potasio (0,441 mmol), éter corona (18-crown-6) (0,239 mmol) y catalizador de transferencia de fase ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_3_4\text{NI}$) (0,0239 mmol). La reacción se deja agitando vigorosamente hasta la desaparición de N^5,N^{10} -dióxido de 2-hidroxifenazina (72 horas). El seguimiento de la reacción se realiza por CCF en sílica con una mezcla de EP:AE (20:80) como fase móvil. Transcurrido el tiempo, se destila el disolvente a presión reducida. Posteriormente se agregan 30 mL de agua y se extrae la mezcla con AE (3 x 35 mL). Las capas orgánicas se secan con Na_2SO_4 anhidro, el disolvente es evaporado a presión reducida. El producto se purifica mediante CC en sílica usando como fase móvil EP: AcOEt.



Rendimiento: 47%

Aspecto: Sólido naranja

Fórmula empírica: $\text{C}_{23}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_5$

Punto de fusión ($^{\circ}\text{C}$): 180-183

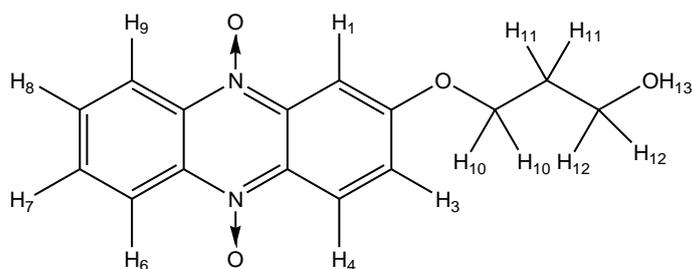
^1H (DMSO, 400 MHz) δ_{H} (ppm): 8,57 (2H, d, J 8,30 Hz, H_6+H_9), 8,47 (1H, d, J 9,65 Hz, H_4), 7,92 (1H, m, $\text{H}_{7/8}$), 7,85 (5H, m, $\text{H}_{7/8}+\text{H}_{13}+\text{H}_{14}+\text{H}_{15}+\text{H}_{16}$), 7,78 (1H, d, J 2,60 Hz, H_1), 7,41 (1H, dd, J_{1-3} 2,62 Hz, J_{3-4} 9,58 Hz, H_3), 4,30 (2H, t, J 5,73 Hz, H_{10}), 3,84 (2H, t, J 6,63 Hz, H_{12}), 2,19 (2H, m, H_{11}).

^{13}C -NMR δ_{C} (ppm) (a partir de experimentos de HSQC y HMBC): 135,06, 134,80, 131,34, 131,06, 125,10 (C- H_3), 123,96, 123,33, 122,01 (C- H_4), 119,94, 119,34, 97,41 (C- H_1), 67,26 (C- H_{10}), 35,22 (C- H_{12}), 27,74 (C- H_{11})

MS, m/z (%): 415,15 (M^+ , 3), 399,15 (11), 383,15 (2).

7.1.5 Síntesis de N^5,N^{10} -dióxido de 2-hidroxi-propiloxifenazina (**6**)

En un balón de 50 mL bajo atmósfera de nitrógeno se disuelven 0,957 mmol de N^5,N^{10} - dióxido de 2-hidroxifenazina en 20 mL de acetona. Luego se agrega 3-bromopropanol (0,957 mmol), carbonato de potasio (0,957 mmol), éter corona (18-crown-6) (0,957 mmol) y catalizador de transferencia de fase ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_3\text{NI}$) (0,0957 mmol). La reacción se deja agitando vigorosamente hasta ver la aparición del producto (7 días). El seguimiento de la reacción se realiza por CCF en alúmina con una mezcla de $\text{Cl}_2\text{CH}_4:\text{MeOH}$ (98:2) como fase móvil. Transcurrido el tiempo, se destila el disolvente a presión reducida. Posteriormente se agregan 30 mL de agua y unas gotas de HCl y se extrae la mezcla con AE (3 x 35 mL). Las capas orgánicas se secan con Na_2SO_4 anhidro, el disolvente es evaporado a presión reducida. El producto se purifica mediante CC en alúmina usando como fase móvil $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$ (99:1)



Rendimiento: 49%.

Aspecto: sólido naranja.

Formula empírica: $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_4$

Punto de fusión ($^{\circ}\text{C}$): 163-167

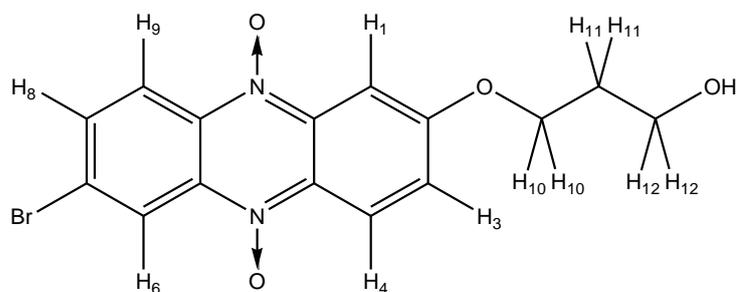
^1H (DMSO, 400 MHz) δ_{H} (ppm): 8,54 (2H, m, H_6+H_9), 8,48 (1H, d, J 9,66 Hz, H_4), 7,91 (2H, m, H_7+H_8), 7,81 (1H, d, J 2,56 Hz, H_1), 7,57 (1H, dd, J_{3-4} 9,63, J_{1-3} 2,62 Hz, H_3), 4,69 (1H, t, J 5,21 Hz, H_{13}), 4,30 (2H, t, J 6,35 Hz, H_{10}), 3,66 (2H, dt, J 5,97, 11,54 Hz, H_{12}), 1,99 (2H, m, H_{11}).

^{13}C -NMR δ_{C} (ppm) (a partir de experimentos de HSQC y HMBC): 161,55 ($\text{H}_1\text{C}-\text{C}-\text{O}$), 137,14 (N-C- CH_1), 136,12 ($\text{H}_9\text{C}-\text{C}-\text{N}$), 134,84 ($\text{H}_6\text{C}-\text{C}-\text{N}$), 132,20 (N-C- CH_4), 132,03 (C- H_8), 130,95 (C- H_7), 125,74 (C- H_3), 121,98 (C- H_4), 120,12 (C- H_6), 119,85 (C- H_9), 97,69 (C- H_1), 66,64 (C- H_{10}), 57,59 (C- H_{12}), 32,16 (C- H_{11}).

MS, m/z (%): 286,1 (M^+ , 80), 270,1 (21), 253,1 (3).

7.1.6 Síntesis de N^5, N^{10} -dióxido de 7(8)-bromo-2-hidroxi-propiloxifenazina (**7**)

En un balón de 50 mL bajo atmósfera de nitrógeno se disuelven (0,841 mmol) de N^5, N^{10} -dióxido de (7)8-bromo 2-hidroxifenazina en 30 mL de acetona. Luego se agrega 3-bromopropanol (0,841 mmol), carbonato de potasio (0,841 mmol), éter corona (18-crown-6) (0,841 mmol), y catalizador de transferencia de fase ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_3\text{NI}$) (0,0841 mmol). La reacción se deja agitando vigorosamente hasta la desaparición de N^5, N^{10} -dióxido de (7)8-bromo-2-hidroxifenazina (96 horas). El seguimiento de la reacción se realiza por CCF en sílica con una mezcla de EP:AE (20:80) como fase móvil. Transcurrido el tiempo se destila el disolvente a presión reducida. Posteriormente se agregan 30 mL de agua y se extrae la mezcla de reacción con AE (3 x 35 mL). Las capas orgánicas se secan con Na_2SO_4 anhidro, el disolvente se evapora a presión reducida. El producto se purifica mediante CC en sílica usando como fase móvil EP:AcOEt.



Rendimiento: 23%

Aspecto: Sólido naranja.

Fórmula empírica: $\text{C}_{15}\text{H}_{13}\text{BrN}_2\text{O}_4$

7-isómero: ^1H (MeOD, 400 MHz) δ_{H} (ppm): 8,84 (1H, d, J 1,9 Hz, H_6), 8,57 (2H, dd, J 9,7, J 1,6 H_4+H_9), 8,06 (1H, dd, J 9,3, J 1,9 Hz, H_7), 7,92 (1H, d, J 2,7 Hz, H_1), 7,61 (1H, dd, J 9,7, J 2,5 Hz, H_3), 4,39 (2H, t, J 6,2 Hz, H_{10}), 3,83 (2H, t, J 6,2 Hz, H_{10}), 2,15 (2H, m, H_{11}).

^{13}C -NMR δ_{C} (ppm) (a partir de experimentos de HSQC y HMBC): 162,49 ($\text{H}_1\text{C-C-O}$), 137,37 (N-C- CH_4) 134,97 (C-Br), 134,74 (C- H_7), 133,70 ($\text{H}_6\text{C-C-N}$), 131 (N-C- CH_1), 126,29 (C- H_3), 124,86 ($\text{H}_9\text{C-C-N}$), 121,46 (C- H_9), 121,16 (C- H_6), 121,11 (C- H_4), 96,88 (C- H_1), 66,11 (C- H_{10}), 57,81 (C- H_{12}), 31,67 (C- H_{11}).

7.2 Evaluación biológica

7.2.1 Evaluación de la capacidad de interacción con ADN mediante espectroscopía de fluorescencia

Se prepara una solución de ADN 2,5 mg/mL, disolviendo 12,5 mg de ADN puro de timo de ternera, (Sigma Chemical Co., USA) en 5,0 mL de buffer fosfato (50 mM; pH 6,0). La solución se agita magnéticamente 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 se mantiene la concentración de compuesto constante (20 µM) y se varía la concentración de ADN en un rango de 0 a 400 µM, manteniendo constante el volumen de la solución, con un 20% de DMSO. Se incuba el compuesto con el ADN a 37°C durante 30 minutos y luego se procede a realizar las medidas. Los espectros de emisión se registran entre 425 nm y 825 nm, excitando a la longitud de onda de absorción máxima, con un ancho de banda de 12 nm. Todas las lecturas se realizan por triplicado.

7.2.2 Evaluación de la capacidad de interacción con ADN mediante electroforesis⁶

Cultivo de bacterias

Los cultivos líquidos de bacterias se realizaron en medio LB (bactotripton 10 g, extracto de levadura 5 g, NaCl 10 g, agua c.s.p 1 L, pH 7,5) a 37 °C con agitación a 220 rpm. Para el crecimiento de bacterias transformadas con plásmidos portadores de marcadores de resistencia a Ampicilina, se agregó al medio el antibiótico a una concentración de 50 µg/mL. Los stocks de bacterias se conservaron a -80 °C en medio usando un cultivo en fase de crecimiento exponencial en medio LB suplementado con glicerol a una concentración final de 15 %. Para este trabajo se utilizó una cepa de *E. coli* XL1 transformada con plásmido pBluescript KSII (Stratagene) (Figura 7.1).

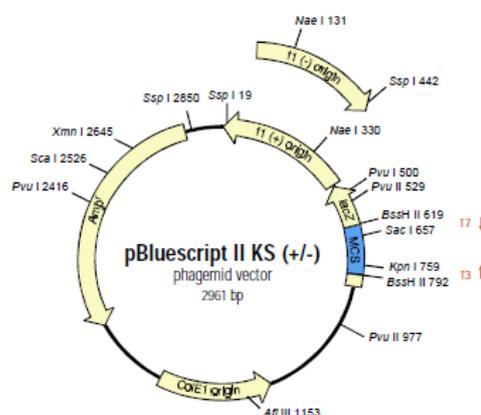


Figura 7.1- Plásmido pBluescript KSII. Extraído de⁷.

Obtención de ADN plasmídico

La extracción de ADN plasmídico en pequeñas cantidades se realiza por el método de lisis alcalina⁸ a partir de 3mL de cultivos de la cepa XL1 de *E. coli* transformada con el plásmido correspondiente. Sintéticamente, se resuspenden cultivos en fase estacionaria en *buffer* SET (sacarosa 20%, Tris-HCl 50mM pH 7,6, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 6,5mM) y se lisan con una solución hidróxido de Sodio 0,2N, dodecilsulfato sódico (SDS) 1%. La solución se neutraliza con acetato de sodio 3M pH 4,8, se deja 30 minutos en hielo y se centrifuga a 4°C y 12.000 durante 20 minutos. El sobrenadante se precipita con un volumen de isopropanol, lavándose posteriormente con etanol 70%. La resuspensión se realiza en un volumen adecuado de agua purificada por MiliQ (generalmente 40µL).

Medida de la concentración de ADN

La concentración de ADN se calculó a partir de medidas de absorbancia a 260 nm teniendo en cuenta que 1 unidad de absorbancia corresponde a una concentración de 50 µg/mL de ADN doble hebra. Para estimar la pureza de la muestra se determinó también la absorbancia 280 nm (longitud de onda a la que absorben las proteínas fundamentalmente). El ADN puro da una relación de A260/A280 de 1,7.

Incubación del plásmido con concentraciones crecientes de DMSO

Se realizó una incubación de 300 ng de plásmido con 2 µL de *buffer* Tris EDTA (TE Tris 0,5 M EDTA 0,5 M pH 7,4) con concentraciones crecientes de dimetil sulfóxido (DMSO) (5, 10, 20, 40, 50 % final) en un volumen total de reacción de 20 µL por 24 h a 37 °C.

Incubación de los derivados de N⁵,N¹⁰-dióxido de fenazina con ADN plasmídico

Los compuestos fueron disueltos en DMSO (0,8 mg en 1 mL de DMSO) e incubados con ADN purificado (300 ng) y con *buffer* Tris EDTA (TE Tris 0,5 M EDTA 0,5 M pH 7,4) en un volumen final de reacción de 20 µL por 24 h a 37 °C. Los compuestos fueron ensayados en varios r_i , donde r_i es la relación moles de compuesto/moles de pares de bases). Todas las diluciones posteriores también se realizaron en 100 % DMSO, de las cuales se tomaron alícuotas inferiores a los 10 µL, de manera que el volumen final de DMSO no supere el 50 % del volumen final.

Electroforesis en gel de agarosa

Los fragmentos de ADN se analizaron por electroforesis en gel de agarosa 0.8%. Los geles se prepararon en *buffer* TBE (Tris-borato 90 mM, EDTA 0,5 M, pH 8,0), y este mismo *buffer* es utilizado como *buffer* de corrida. La separación se realiza a 90 V por 90 minutos. Luego de la

incubación se agregó a las muestras *buffer* de carga a las muestras (azul de bromofenol 25 %, glicerol 50 %, EDTA 25 mM, pH 8,0) y se realizó una electroforesis. En el caso de los geles sin bromuro de etidio, el mismo debió ser teñido con una solución de bromuro de etidio 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ por 30 min. Se visualizó el gel bajo luz ultravioleta.

7.3 Bibliografía

- (1) Cerecetto, H.; González, M.; Lavaggi M.L.; Porcal, W. (2005) *“Preparation of phenazine N⁵,N¹⁰-dioxides. Effects of benzofuroxan substituents in the outcome of their expansion reaction with phenolates”*. Journal of the Brazilian Chemical Society. 16, 1290-12296.
- (2) Porcal, W.; Hernández, P.; Boiani, L.; Boiani, M.; Ferreira, A.; Chidichimo, A.; Cazzulo, J.J.; Olea-Azar, C.; González, M.; Cerecetto, H. (2008) *“New trypanocidal hybrid compounds from the association of hydrazone moieties and benzofuroxan heterocycle”*. Bioorganic and Medicinal Chemistry.15; 6995-7004.
- (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. (2005) *“Novel Cu(II) Quinoxaline N,N'-dioxide complexes as selective hypoxic cytotoxins”*. European Journal of Medicinal Chemistry. 40,473-480.
- (4) Ludwig, G.-W.; Baumgartel, H. (1982) *“Isomerengildung bei der benzofurazan N-oxide mit fenolaten”*. Chemical Bericht. 115, 2380-2382.
- (5) Cerecetto, H.; González, M.; Lavaggi, M.L.; Azqueta, A.; Ezpeleta, O.; López de Cerain, A.; Monge-Vega, A. (2005) *“Phenazine N⁵N¹⁰-Dioxide Derivatives as Hypoxic Selective Cytotoxins”*. Journal of Medicinal Chemistry, 48, 21-23, 2005.
- (6) Guggeri, L. *“Evaluación de complejos de vanadio como potenciales agentes anti-protosarios kinetoplástidos y estudio de si interacción con ADN”*. Tesina de Grado, Universidad de la República.
- (7) http://bio.classes.ucsc.edu/bio20L/info/content/molbio2/pbluescript_2_ks.pdf (acceso Julio 14, 2013).
- (8) Sambrook, J.; Frisch, EF.; Maniatis, T. (1989) *“Molecular Cloning: a laboratory manual”*. 5ª ed. Cold Spring Harbour Laboratory Press. Nueva York, Estados Unidos.