



Universidad de la República
Informe de pasantía
Licenciatura en Biología Humana
Perfil: Desarrollo de fármacos

**EVALUACIÓN BIOLÓGICA DE PROFÁRMACOS ANTITUMORALES
SELECTIVOS PARA CÉLULAS HIPÓXICAS.**

Estudiante: Isabel Volz.

Tutor: María Laura Lavaggi.

Orientador de Pasantía: María Laura Lavaggi.

Laboratorio de Química Orgánica, IQB, Facultad de Ciencias, UdelaR.

**“Deberíamos vivir tantas veces como los árboles,
que pasado un año malo echan nuevas hojas y
vuelven a empezar”.**

José Luis Sampedro.

Escritor Español.

(1917-2013)

Agradecimientos

A mi tutora María Laura que desde el principio con mucha paciencia me guio y enseñó y nunca dejo de apoyarme.

A todos los compañeros del laboratorio de Química Orgánica que no dudaron nunca en compartir sus conocimientos y su tiempo conmigo.

A mi padre, gracias con todo mi corazón, nunca perdiste la fe en que podía cumplir mis sueños si me lo proponía, pero lo más importante me mostraste que siempre se puede volver a empezar.

A mi madre y a mi abuela, las dos mujeres más luchadoras que conozco y que siempre me han enseñado con su ejemplo.

A mis hijos y a David que se llenaron de paciencia y a su manera intentaron comprender lo que esto significa para mí apoyándome y dando me aliento a pesar de la distancia que debía recorrer cada semana lejos de casa.

A mi querido hermano Juan Carlos que con su ejemplo nunca me dejo bajar los brazos, que sepas que siempre te he escuchado.

A mí querida familia y amigos, gracias por aceptarme como soy y demostrar interés cada vez que les cuento sobre lo que hago. Gracias por alegrarse con cada examen aprobado y con cada logro conseguido como si fuera con ustedes mismos.

Índice General

1- Resumen.....	6
2- Introducción y antecedentes.....	7
2.1- Hipoxia tumoral.....	8
2.2- Derivados de N-óxido de aminas terciarias y aromáticas como profármacos bioreducibles en hipoxia.....	10
2.3- Microemulsiones lipídicas.....	11
3- Objetivos.....	12
3.1- Objetivo general.....	12
3.2- Objetvos específicos.....	12
4- Materiales y Métodos.....	12
4.1- Capacidad de bioreducción.....	12
4.2- Identificación de enzimas.....	13
4.3- Preparación de microemulsiones lipídicas, vehículo.....	14
4.4- Ensayos de citotoxicidad.....	14
4.5- Ensayos de citotoxicidad.....	14
5- Resultados.....	15

5.1- Síntesis de posibles metabolitos identificables en el proceso de bio-reducción de los derivados de N,N'-dióxido de fenazina.....	14
5.2- Evaluación de la capacidad bio-reductiva de los derivados de N,N'-dióxido de fenazina utilizando homogeneizada de hepatocitos de rata en condiciones de hipoxia y normoxia.....	17
5.3- Identificación de las enzimas involucradas en la bio-reducción de los derivados de N,N'-dióxido de fenazina utilizando homogeneizado de hepatocitos de rata en condiciones de hipoxia y normoxia.....	19
5.4- Estudio de la actividad biológica de los compuestos sintetizados. Ensayo de citotoxicidad en condiciones de normoxia en la línea celular V79.....	21
5.4.1- Fundamento de la técnica.....	21
5.4.2- Eficiencia clonogénica de líneas celulares.....	21
5.4.3- Descripción del ensayo de clonación.....	21
5.4.4- Interpretación de resultados.....	22
5.4.5- Compuestos evaluados en el ensayo de citotoxicidad.....	22
5.5- Determinación de la influencia del uso de liposomas en la citotoxicidad en condiciones de normoxia en la línea V79.....	24
6- Discusión.....	25
7- Conclusiones y Perspectivas.....	26
8- Bibliografía.....	27

1-Resumen

Los tumores sólidos se caracterizan por la formación de una masa celular cuya neovascularización es inadecuada, llevando al desarrollo de poblaciones celulares distantes de vasos sanguíneos y como consecuencia hipóxicas. La hipoxia está confinada en el tumor sólido y por lo tanto representa un blanco que puede ser explotado para eliminar selectivamente las células tumorales en los tumores sólidos.

Se ha desarrollado un grupo especial de agentes citotóxicos conocidos como citotoxinas selectivas en hipoxia también conocidas como profármacos bio-reducibles, intercalantes de ADN que combinan dos farmacóforos, el grupo *N*'-óxido y el heterociclo fenazina, así como cadenas laterales que potencian la interacción con el ADN y estabilizan la unión con esta biomolécula. Dichos profármacos son compuestos inactivos que se reducen enzimáticamente al fármaco biológicamente activo cuya selectividad está en función de la hipoxia del tejido en cuestión y del nivel de enzimas reductoras del tejido como por ejemplo NADPH:citocromo P450 reductasa, citocromo P450, DT-diaforasa.

Mediante estudios de metabolización enzimática utilizando fracción microsomal y citosólica de hepatocitos de rata y ensayos de citotoxicidad en condiciones de hipoxia y normoxia se evaluó la capacidad citotóxica y bio-reductiva de potenciales profármacos antitumorales bio-reducibles diseñados para células hipoxicas derivados de *N,N*'-dióxido de fenazinas previamente sintetizados.

Por otro lado las microemulsiones lipídicas han sido utilizadas con éxito como vehículos de diferentes fármacos entre ellos antineoplásicos. En ese sentido se evaluó la posibilidad de utilizar microemulsiones lipídicas de los derivados de *N,N*'-dióxido de fenazinas para la evaluación de su capacidad citotóxica en normoxia e hipoxia en forma de aproximación a su potencial uso como vehículo para ensayos de evaluación biológica *in vivo*.

Palabras claves: tumor sólido; hipoxia; fenazinas; microemulsión lipídica.

2- Introducción y Antecedentes

El cáncer no es una enfermedad única. Bajo esta denominación se agrupan una multitud de diferentes procesos clínicos, con un comportamiento absolutamente diferente. Hay más de 100 diferentes tipos de cáncer, sin embargo, todos ellos tienen un denominador común: las células cancerosas adquieren la capacidad de multiplicarse y diseminarse por todo el organismo sin control. Las células cancerosas contradicen las reglas más básicas del comportamiento por las cuales se forman y mantienen los organismos pluricelulares, aprovechando todo tipo de oportunidades para hacerlo. Estas células proliferan desafiando los controles normales, son neoplásicas y son capaces de invadir y colonizar los tejidos de su entorno (malignas). Se cree que la mayoría de los cánceres se originan a partir de una sola célula que ha experimentado una mutación inicial, pero posteriormente su progenie ha de sufrir otros cambios y para que alguna de estas células se convierta en cancerosa serán necesarias un gran número de mutaciones adicionales que terminaran por proporcionar un conjunto de propiedades dañinas: alteraciones en las vías de señalización celular que normalmente mantienen la proliferación celular bajo un estricto control; ignorar las señales de suicidio y eludir las limitaciones programadas de proliferación incluyendo la senescencia replicativa y las rutas normales de diferenciación (Alberts et al., 2004).

En Uruguay el cáncer es responsable del 25% de las muertes, en hombres, el cáncer de próstata es el más frecuente seguido por el cáncer de pulmón y el colo-recto (cánceres de colon y recto reunidos). Sin embargo, el cáncer de pulmón sigue siendo la causa de muerte más importante en hombres ya que anualmente casi 1000 uruguayos mueren por esta enfermedad. En mujeres, el cáncer de mama es el que posee la mayor tasa de incidencia y también de mortalidad. Unos 1800 casos nuevos de cáncer de mama se diagnostican anualmente y causa la muerte de más de 650 mujeres en igual período. El cáncer de colo-recto ocupa el segundo lugar en incidencia seguido por el cáncer cervico-uterino (CHLCC, 2009).

Aún con la gran cantidad de estudios que se han realizado sobre el cáncer desde diferentes aspectos, ya sean biológicos o bioquímicos, no se ha desarrollado un tratamiento eficaz y seguro. Hoy en día como tratamientos contamos con la remoción quirúrgica de tumores (Rosenberg, 2008), la radioterapia (Hellman, 2008) y la quimioterapia (Schwarz, 2008). Cuando aparecen múltiples metástasis la remoción quirúrgica se hace casi imposible.

Los tumores sólidos corresponden a la presencia de una masa sólida formada por células neoplásicas, ubicadas en cualquier sitio anatómico y de diferentes tipos histológicos cuya neovascularización es inadecuada y está alterada, llevando al desarrollo de poblaciones celulares distantes de los vasos sanguíneos y como consecuencia hipóxicas (fig. 1). La hipoxia es una de la característica en los tumores sólidos que contribuye local y sistemáticamente a la progresión tumoral, aumentando la resistencia a la quimio y radioterapia de dicha célula.

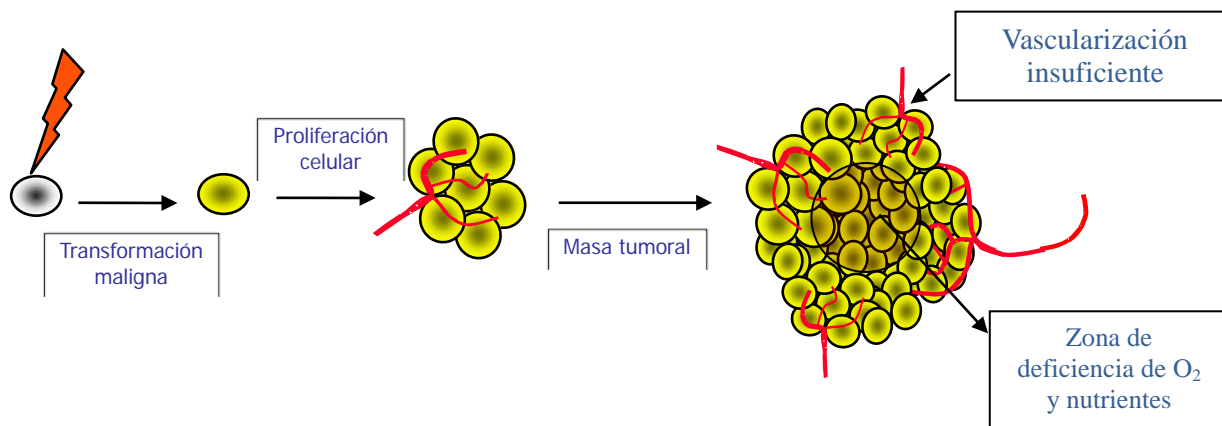


Figura 1– Formación de zonas de hipoxia en tumores sólidos.

2.1 Hipoxia tumoral

La hipoxia es un rasgo característico de los tumores sólidos. Se ha acumulado evidencia que hasta un 50-60% de los tumores sólidos contienen regiones hipóxicas con una tensión de oxígeno considerablemente menor que los tejidos normales (Vaupel et al., 2007). El rango de tensiones de oxígeno en los tumores sólidos está entre 10 y 30mmHg, mientras que en los tejidos normales es de 24 a 66 mmHg (Brown, 1999). Los bajos niveles de oxígeno inducen a alteraciones en el perfil de expresión génica. El factor de transcripción inducible por hipoxia 1 (HIF-1) juega un rol fundamental en estos cambios, controlando más de 100 genes diana. Los productos de proteína más prominentes de estos genes son la eritropoyetina y factor de crecimiento endotelial vascular, que es un componente clave de la angiogénesis.

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 concentraciones.

En general, la hipoxia se produce cuando la demanda de oxígeno es superior a la entrega. Esta situación puede ser debido a la proliferación celular como, por ejemplo, en el crecimiento del tumor. En este caso, un círculo vicioso puede desarrollarse con la consiguiente activación de HIF1 que conduce a la angiogénesis, que a su vez favorece el crecimiento del tumor (Metzen, 2007).

En cuanto a los terapias convencionales, las células hipóxicas también son más resistentes. Por ejemplo la mayor influencia microambiental en la respuesta del tumor a la radiación es el oxígeno molecular; bajos niveles de oxígeno disminuyen la efectividad de las radiaciones ionizantes donde el mecanismo de acción citotóxica depende de la generación de especies reactivas del oxígeno. A esto le sumamos que células más hipóxicas no están experimentando activamente la división celular, impidiendo así la eficacia de los agentes quimioterapéuticos convencionales que se dirigen a células que se dividen activamente (De Vita et al., 2008).

Sin embargo aunque la hipoxia tumoral es un problema al conferir resistencia a las terapias farmacológicas actuales, en las circunstancias apropiadas puede ser visto como una ventaja. Por muchos años se vio a la hipoxia solamente como un obstáculo a la hora de combatir el cáncer, sin embargo en las últimas dos décadas se ha comenzado a explotar esta característica única de los tumores sólidos como una diana terapéutica que permite diseñar mecanismos de citotoxicidad selectivos. El primero en proponer esto fue Alan Sartorelli en 1972, medicamentos que requieren activación bio-reductiva se han desarrollado para explotar la deficiencia de oxígeno en estas células en la premisa de que las células hipóxicas deberían mostrar una mayor propensión para el metabolismo reductor que las células bien oxigenadas (Lin et al., 1972).

Todo esto llevó al desarrollo de un grupo especial de agentes citotóxicos conocidos como citotoxinas selectivas en hipoxia también conocidas como profármacos bio-reducibles. Desde el año 1994 nuestro grupo de investigación ha desarrollado diferentes series de compuestos derivados del sistema N-óxido como m.potenciales agentes bio-reducibles (Martinez-Crespo, F.J. et al., 1995), (Monge, A. et al., 1995, 1998), (Cerecetto, H et al., 2000, 201, 2004), (Lavaggi, M.L. et al., 2004); ya en el año 2003 (Lavaggi M.L., 2004), se comenzó a trabajar con compuestos capaces de actuar como intercalantes de ADN. Estos agentes citotóxicos son conocidos como citotoxinas selectivas en hipoxia o como profármacos bio-reducibles, intercalantes de ADN que combinan dos farmacóforos, el grupo N-óxido y el heterociclo fenazina, *figura 2*, así como cadenas laterales que potencian la interacción con el ADN y estabilizan la unión con esta biomolécula. Estos agentes, que son atractivos como fármacos antineoplásicos por su selectividad hacia tumores sólidos, deben esta selectividad al grado de hipoxia del tejido en cuestión y al nivel de enzimas reductoras del tejido, por ejemplo NADPH: citocromo P450 reductasa, citocromo P450, DT-diaforasa y óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) (Ross et al., 1996). Dichos profármacos son compuestos inactivos que se reducen enzimáticamente al fármaco biológicamente activo

causando daño en el ADN directamente o por la transformación química. En condiciones de normoxia este intermedio activado se descompone rápidamente al compuesto de partida en una reacción dependiente de oxígeno (Lavaggi *et al* 2008).

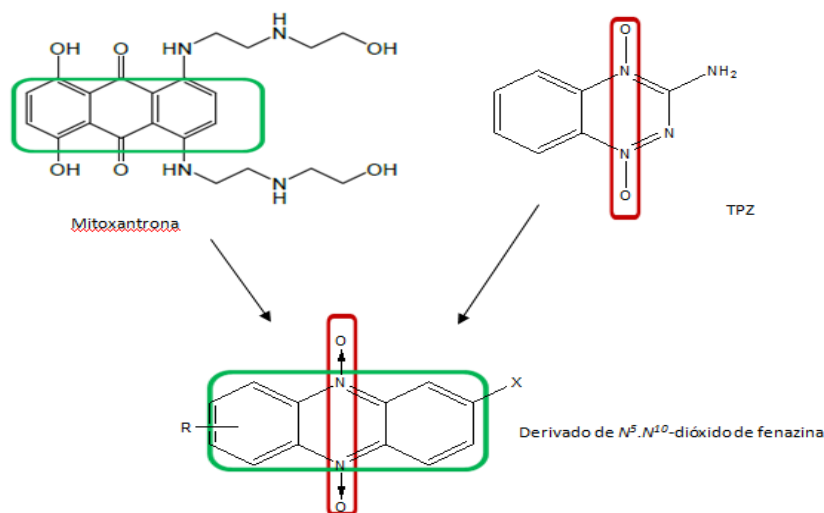


Figura 2- Esquema general del diseño de derivados de N⁵,N¹⁰-dióxido de fenazina.

La DT-diaforasa (E.C.1.6.99.2, NAD(P)H quinona oxidoreductasa; NQO1), es la única flavoenzima que existe como dímero capaz de reducir quinonas con 2 electrones, encargada de detoxificación de xenobióticos de fase II y que por lo tanto se encuentra predominantemente (90%) en el citosol. Los monómeros se encuentran asociados no covalentemente con un grupo FAD como grupo prostético. La enzima cataliza la reducción de quinonas a sus respectivas hidroquinonas utilizando con la misma eficiencia NADH o NADPH como donadores de electrones (Hosoda *et al.*, 1974). También puede utilizar compuestos no-quinónicos como otros sustratos aceptores de electrones, un ejemplo lo constituyen algunos di-N-óxidos de aminas aromáticas como es el caso de dióxido de fenazina. La reacción catalizada por DT-diaforasa transcurre vía un mecanismo “Ping Pong” donde la enzima forma un complejo binario con el donador de electrones, se disocia, reacciona luego con el sustrato aceptor de electrones y se disocia dando el producto.

2.2 Derivados de N-óxido de aminas terciarias y aromáticas como profármacos bio reducibles en hipoxia.

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 nitrógeno. Esta función está presente en tres tipos de compuestos, N-óxido de aminas terciarias y aromáticas, N-óxido de iminas o nitronas y N-óxido de nitrilo. Sólo la primera clase de compuestos ha sido descrita como agentes bio-reducibles. En un caso cuando el N-óxido es bio-reducido en un proceso vía un electrón, se genera un metabolito citotóxico, el radical nitróxido, *figura 3*. En presencia de oxígeno, el proceso redox contrario compite con la reducción anterior. Este proceso, probablemente, sería el responsable de la citotoxicidad aeróbica de estos compuestos. Ha sido sugerido que el intermedio radicalario, media un daño oxidativo de ruptura de las hebras de ADN, que a diferencia de quinonas y nitro-compuestos, no involucra unión covalente al ADN y proteínas. (Cerecetto *et al.*, 2005, 2006).

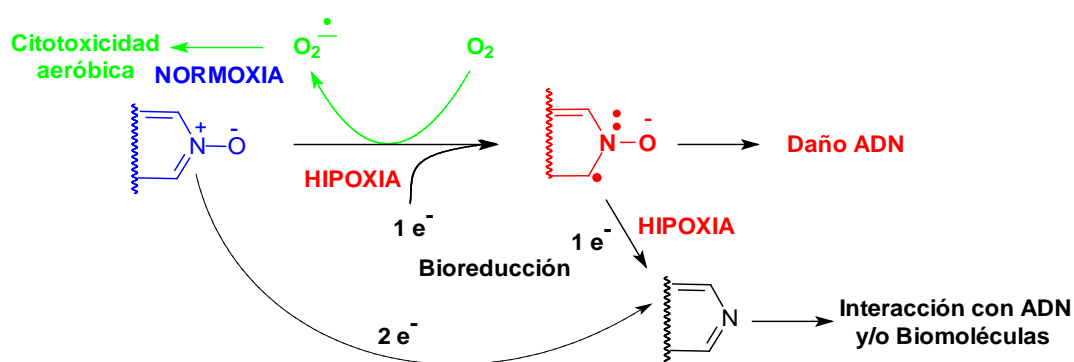


Figura 3– Bio-reducción de derivados de N-óxidos de aminas heterocíclicas.

2.3 Microemulsiones lipídicas

En 1943, Hoar y Schulman describieron por primera vez el término microemulsión, como sistemas transparentes o translúcidos, obtenidos a partir de una emulsión común, siendo esta de aspecto lechoso, que cuando se le adicionaba alcohol de cadenas medianas, el sistema clarificaba, (Garti y Aserin, 1996). Las formas farmacéuticas de antitumorales convencionales son generalmente fármacos solubles o poco solubles en agua formulados en la forma de polvo liofilizado. Esta formulación presenta baja estabilidad, muy baja especificidad y por lo tanto, reducida eficacia terapéutica. Las microemulsiones han sido utilizadas con éxito como vehículos de gran variedad de fármacos y sustancias biológicamente activas como por ejemplo, antiinflamatorios no esteroideos, vacunas, antineoplásicos y analgésicos, (Correa, 1996; Dalmora *et al.*, 2001) y resultados bastantes prometedores se han obtenido con fármacos antineoplásicos cuando son

vehiculizados en sistemas de microemulsiones (Maranhao et al., 2002; Formariz et al., 2007).

En ese sentido sería importante evaluar el potencial uso de emulsiones lipídicas como vehículos de profármacos antitumorales y a su vez determinar in vitro cambios en el perfil de citotoxicidad de los derivados de N^5, N^{10} -dióxido de fenazinas incluidos en estas microemulsiones.

3- Objetivos

3.1- Objetivo General

Estudiar la citotoxicidad y bio-reducción de potenciales profármacos para el tratamiento de células tumorales hipóxicas.

3.2- Objetivos Específicos

- Puesta a punto del ensayo de citotoxicidad y evaluar la capacidad bio-reductiva y citotóxica de los derivados de N, N' -dióxido de fenazina en condiciones de hipoxia y normoxia.
- Estudiar la relación estructura-actividad biológica-afinidad que permita el rediseño de los compuestos para optimizar la actividad biológica deseada.
- Evaluar la capacidad del uso de microemulsiones lipídicas para estudiar la citotóxicidad de los derivados de N, N' -dióxido de fenazinas.

4- Materiales y Métodos.

4.1- Síntesis de Derivados de N^5, N^{10} -dióxido de fenazina.

La secuencia sintética elegida consta de cuatro pasos de reacción, figura 4, que permiten obtener con buen rendimiento un importante número de derivados de N^5, N^{10} -dióxido de fenazina. Así, mediante la expansión de distintos derivados del heterociclo N-óxido de benzo[1,2-c]1,2,5oxadiazol (benzofuroxano) con diferentes derivados de fenol o 1-naftol, a través de un proceso de Beirut (,Haddadin & Issidorides, 1965), se obtienen las correspondientes N^5, N^{10} -dióxido de fenazinas. Posteriormente se procede a la incorporación de cadenas laterales, a través de sustituciones nucleofílicas con distintos halogenuros de arilo.

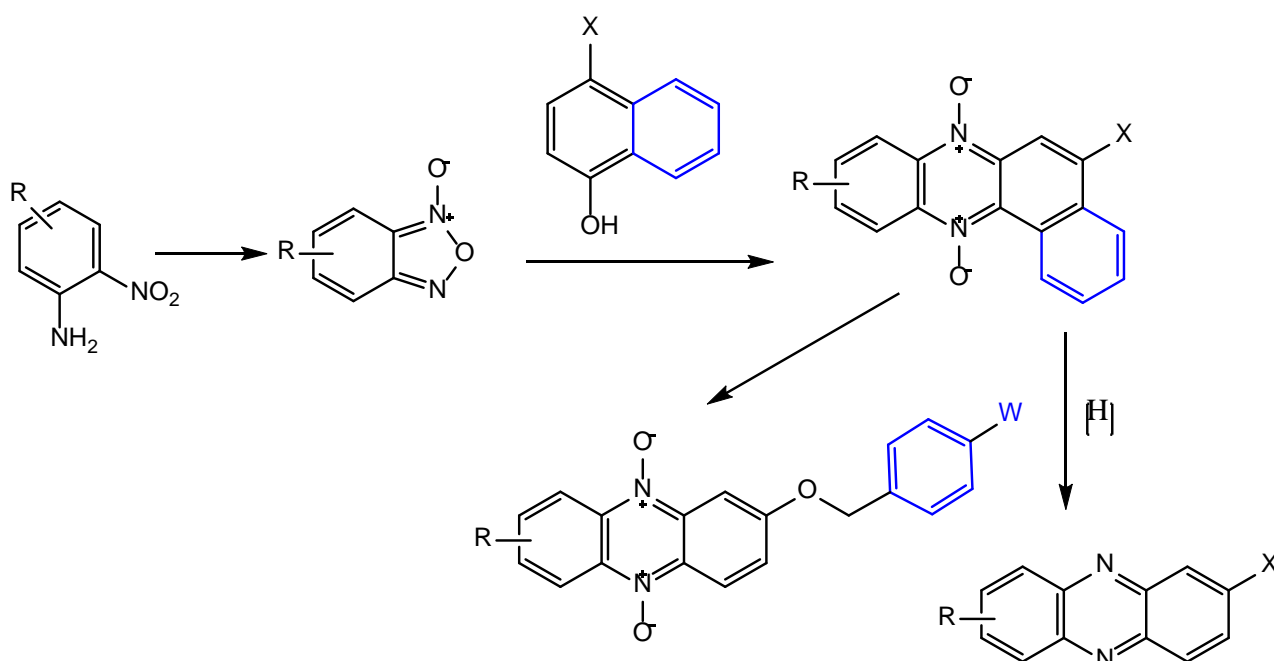


Figura 4- Esquema general del procedimiento sintético utilizado para la obtención de los derivados de fenazina.

4.2- Capacidad de bioreducción.

Mediante estudios de metabolización enzimática y ensayos de citotoxicidad en condiciones de hipoxia y normoxia se determinará el potencial bioreductor de los compuestos diseñados y sintetizados previamente, preparándose patrones en cantidades suficientes para los ensayos. (Lavaggi, 2009), (Nieves, 2011). Los compuestos disueltos en DMSO (40 μ M) son incubados durante 30 minutos a 37°C, en buffer fosfato (0.1M, 1.5 mM EDTA, pH 7.4) con fracciones microsomales o citosólicas obtenidas del homogeneizado de hígado de rata Wistar de 3 semanas de 200g de peso corporal (1mg/mL) y un sistema generador de NADPH (1.3 mM MgCl₂, 40 μ M NADP⁺, 3.5 mM glucosa-6-fosfato, 0.5U/mL glucosa-6-fosfato deshidrogenasa). La bioreducción en condiciones de hipoxia simulada se realiza gaseando con nitrógeno previamente la mezcla de reacción durante 20 minutos. La reacción se detiene agregando 400 μ L de metanol. Los productos se aíslan realizando tres extracciones con 400 μ L de acetato de etilo. El disolvente orgánico se destila a vacío y se resuspende en un volumen mínimo de acetona o acetato de etilo. Se realiza una cromatografía en capa fina (SiO₂, acetato de etilo:hexano 1:1). Se comparan los productos obtenidos con patrones de posibles productos resultantes de la bio-reducción previamente sintetizados. La CCF se revela con luz UV o anisaldehído.

4.3- Identificación de enzimas

Como complemento de los estudios de bio-reducción se estudio la participación de la enzima DT-diaforasa en la bio-reducción utilizando dicumarol como inhibidor de su actividad. En este caso se preincubó la fracción con el inhibidor enzimático y se realizaron las bio-reducciones en iguales condiciones a las descritas anteriormente. Luego mediante CCF se analizan los productos formados.

4.4- Preparación de microemulsiones lipídicas, vehículo.

Constituido por 80 % SF + 20% Tween 80. Los compuestos previamente molidos en mortero se adicionan a la mezcla de SF + Tween 80, se homogeniza el sistema por agitación en cámara de ultrasonido (Ultrasonic Cleaner, Hwashin instruments, Power sonic 405) durante 10 minutos a máxima potencia, se utiliza 10% de DMSO. La suspensión obtenida se deja agitando suavemente 24 horas en agitador orbital.

4.5- Ensayos de citotoxicidad.

Los estudios de actividad biológica se realizan con cultivos en suspensión de la línea celular V79 (fibroblastos de pulmón de hámster chino) obtenida de la ATCC (American Type Cell Culture Collection). En primer lugar se realiza un ensayo de la capacidad de clonación de células sometidas a tratamiento con el agente quimioterápico. El ensayo se efectúa bajo dos condiciones diferentes de gasificación, en atmósfera de aire y en atmósfera de nitrógeno. Se utiliza una concentración inicial de 20 μ M para determinar la citotoxicidad del producto. El cultivo en suspensión de la línea celular se preparo a partir de un cultivo en monocapa en crecimiento exponencial. Se tripsinizan las células y se realiza el recuento de la suspensión celular obtenida en Cámara Neubauer (figura 4). Se ajusto el volumen para obtener una suspensión celular de 90×10^4 células/mL en medio mínimo esencial (DMEM líquido con Hepes (25 mM) suplementado con un 10 % de suero fetal bovino y 1% de penicilina-estreptomicina. En falcons se coloco Hepes (250 μ L), producto que se utilizara para el ensayo (66 μ L), células (en mL la cantidad necesaria para obtener 90×10^4 células/mL) y completo con medio a 10 mL total en los distintos falcons que utilizo para realizar el ensayo con mis distintos productos.

Los falcons se colocan en un agitador orbital a 37 °C durante dos horas. Luego de esto se centrifugan y se retira el sobrenadante de los tubos y las células se resuspenden con jeringas de

2 mL y agujas 21G en 1mL de medio de cultivo. Se realiza el recuento de la suspensión celular con el hemocitómetro y se procede a la siembra de las células en placas de 6 pocillos. Por cada producto y concentración se siembra una placa: en 3 pocillos se siembran 100 células y en los otros 1000 células. En el caso del control negativo se siembran 3 pocillos con 60 células y otros 3 con 90 células. Las células se incuban durante 7 días a 37 °C y luego se determina la capacidad clonogénica o porcentaje de supervivencia.

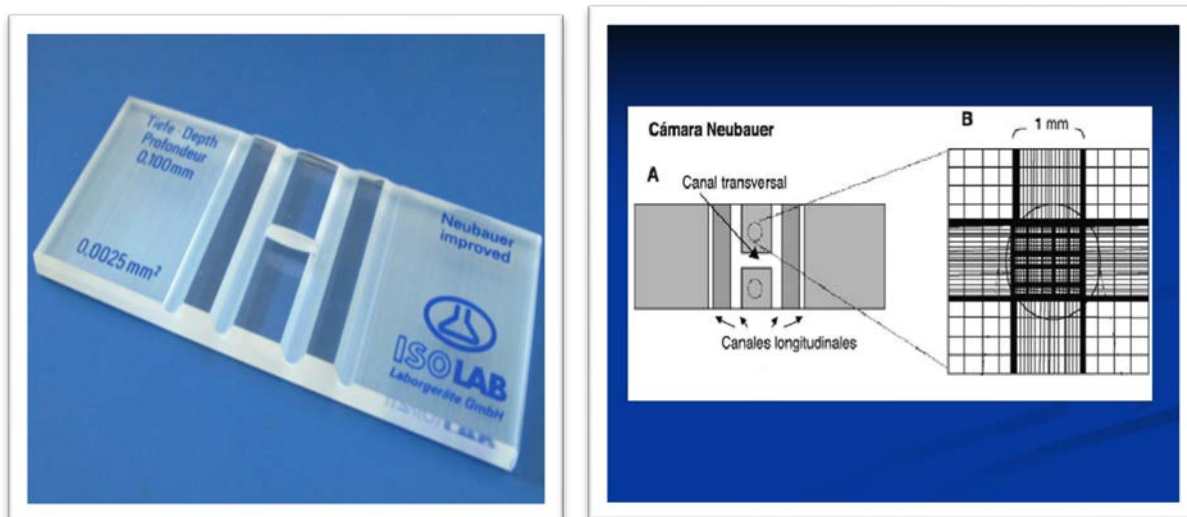


Figura 5- Cámara de Neubauer para realizar recuento celular.

5- Resultados

5.1- Síntesis de posibles metabolitos identificables en el proceso de bio-reducción de los derivados de *N,N'*-dióxido de fenazina

Teniendo en cuenta que se quiere determinar si la citotoxicidad propuesta para los derivados de *N,N'*-dióxido de fenazina está asociada a la bio-reducción en condiciones de hipoxia, se prepararon patrones de los derivados, deoxigenados de los compuestos estudiados en este trabajo (figura 4). La reacción de reducción a nivel de los grupos *N*-óxido se lleva a cabo utilizando como agente reductor ditionito de sodio, descrito como un agente reductor que actúa por un mecanismo de reacción similar al proceso bioquímico de reducción por enzimas (Lavaggi et al., 2008). La reacción se sigue por cromatografía en capa fina y observándose la formación del derivado totalmente reducido y en algún caso del derivado monoxidado. En esta primera etapa se eligió estudiar la capacidad bio-reductiva de algunos derivados previamente evaluados por el grupo de investigación y derivados recientemente obtenidos por el grupo de investigación.

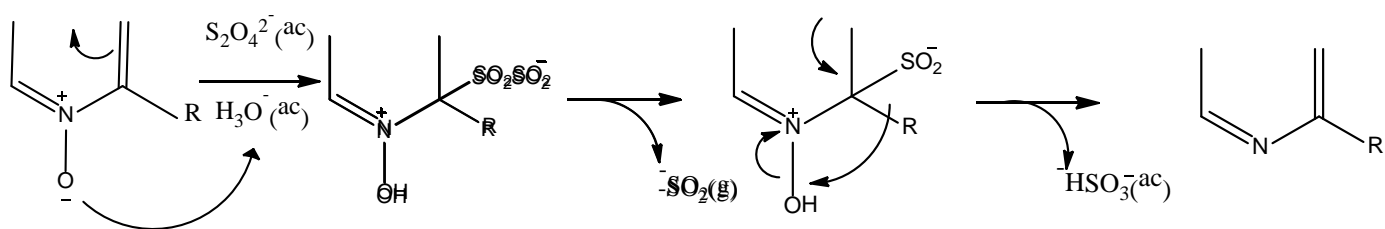
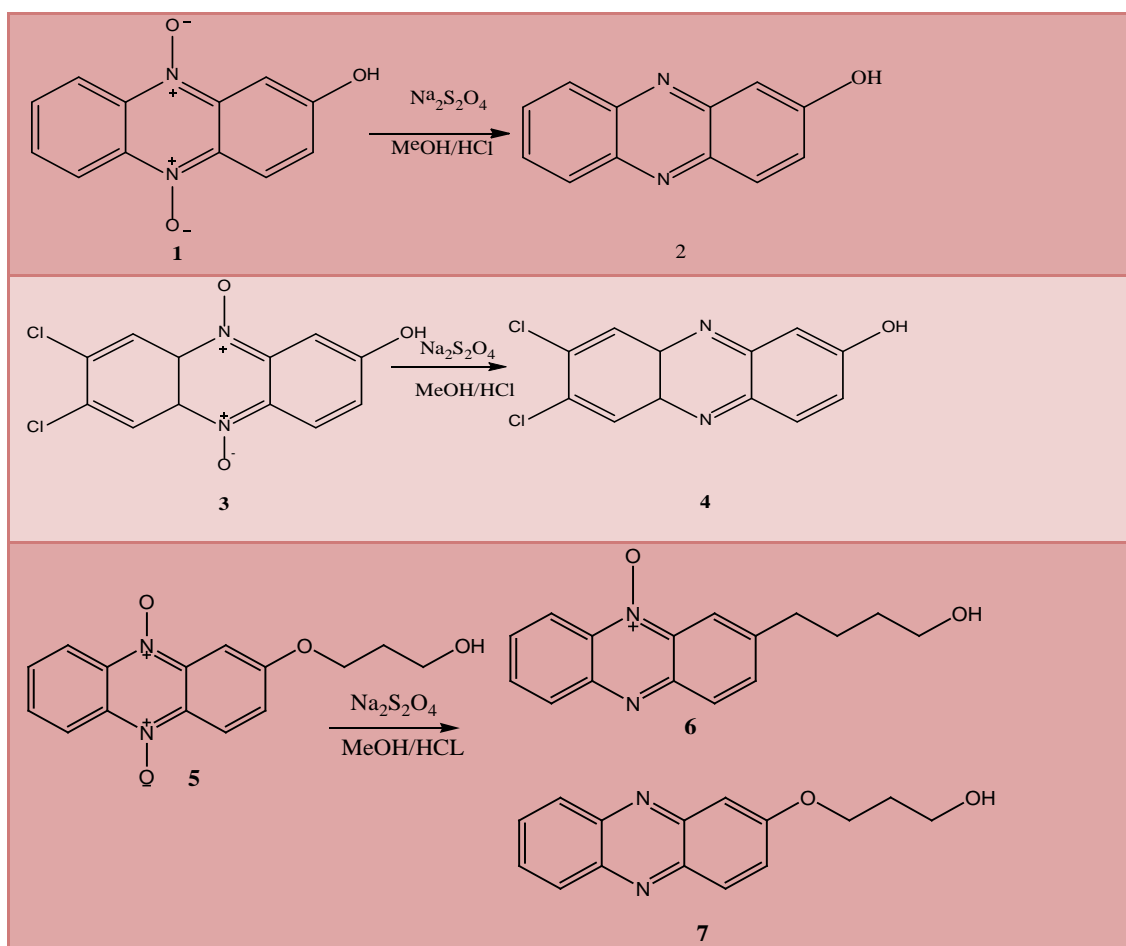
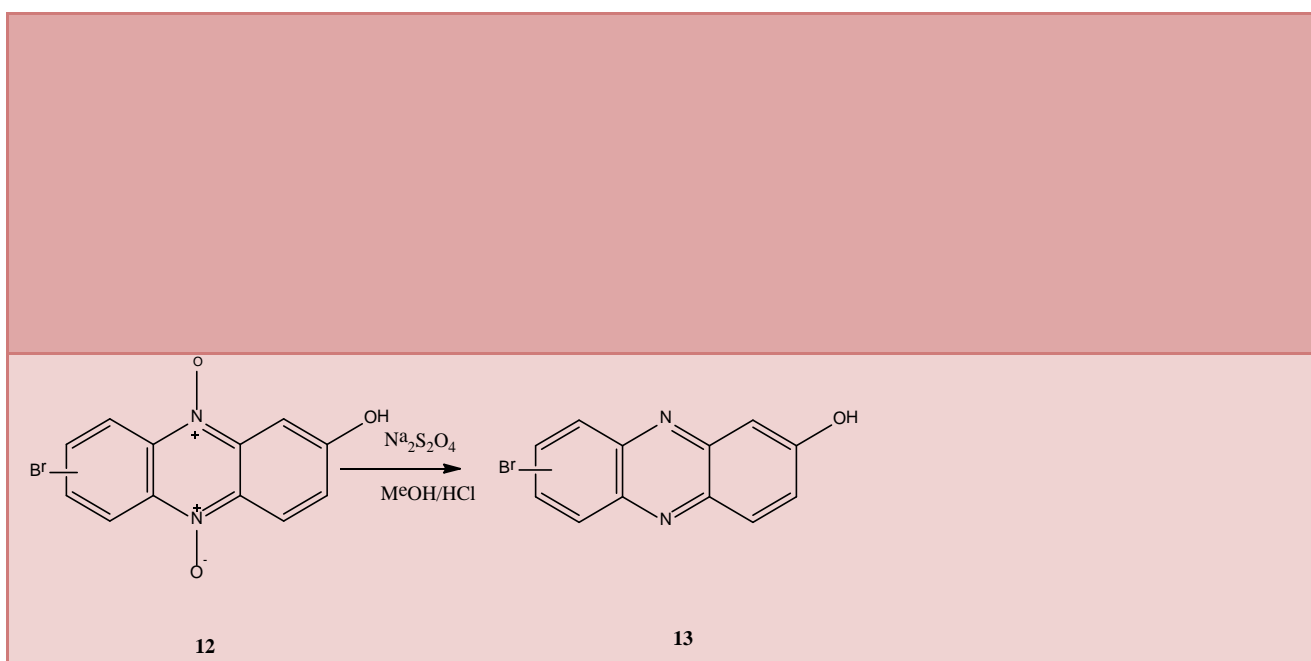
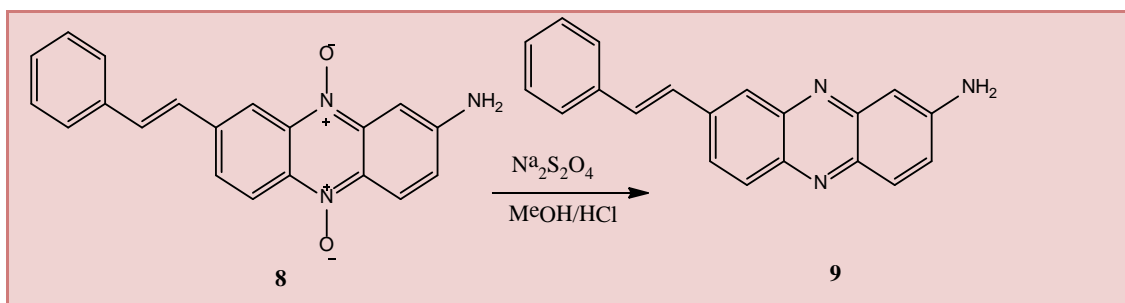


Figura 6- Mecanismo de reducción de grupos N-óxido por acción de ditionito de sodio

La reacción con ditionito de sodio ocurre a través de un ataque nucleofílico en el carbono α al N-óxido por parte del azufre nucleofílico del anión ditionito, seguido de dos pasos de eliminación (figura 4). Esta reducción es, entonces, altamente dependiente del carácter electrofílico del carbono en α a la funcionalidad N-óxido. En la siguiente tabla se resumen los derivados deoxigenados preparados.





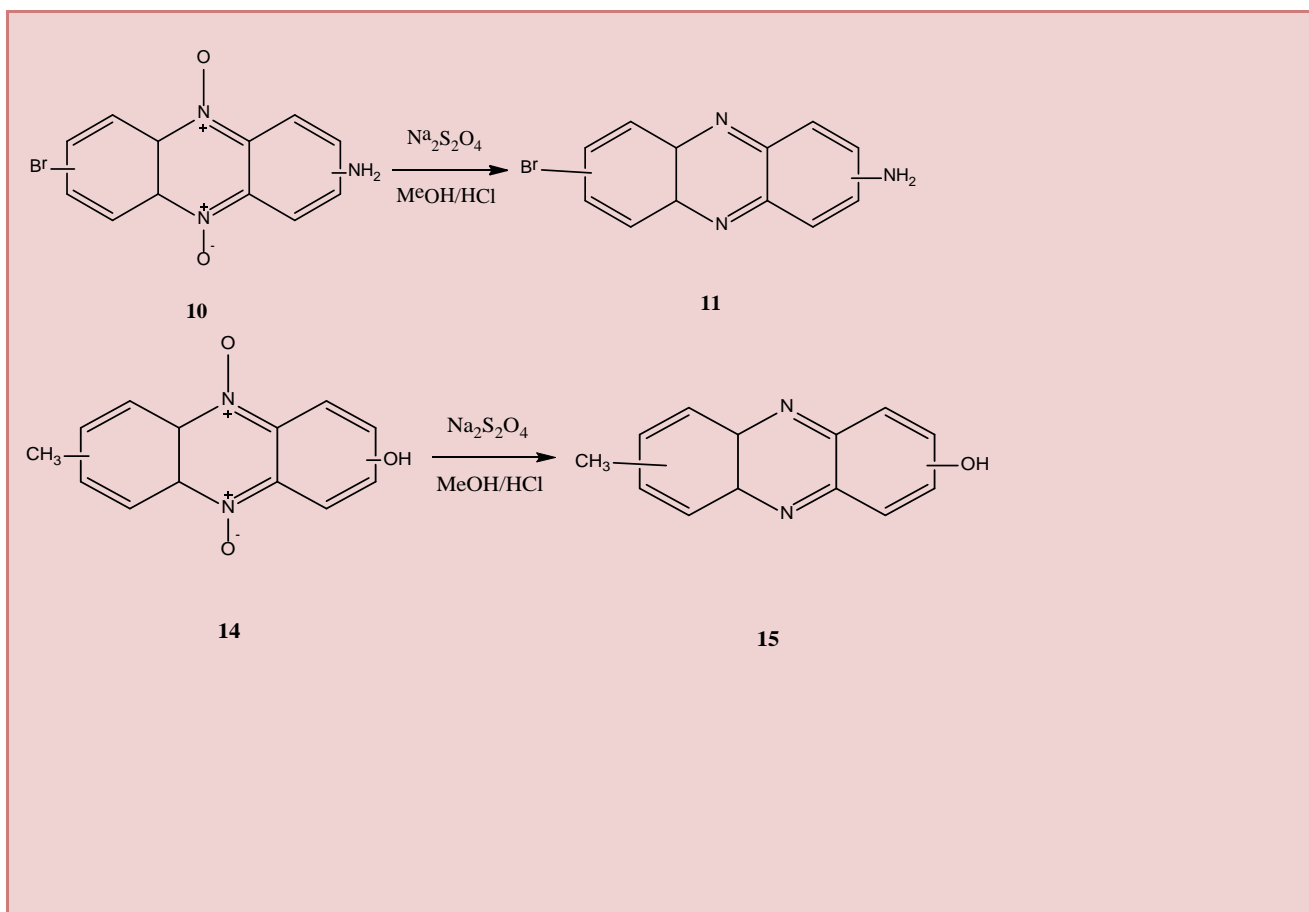


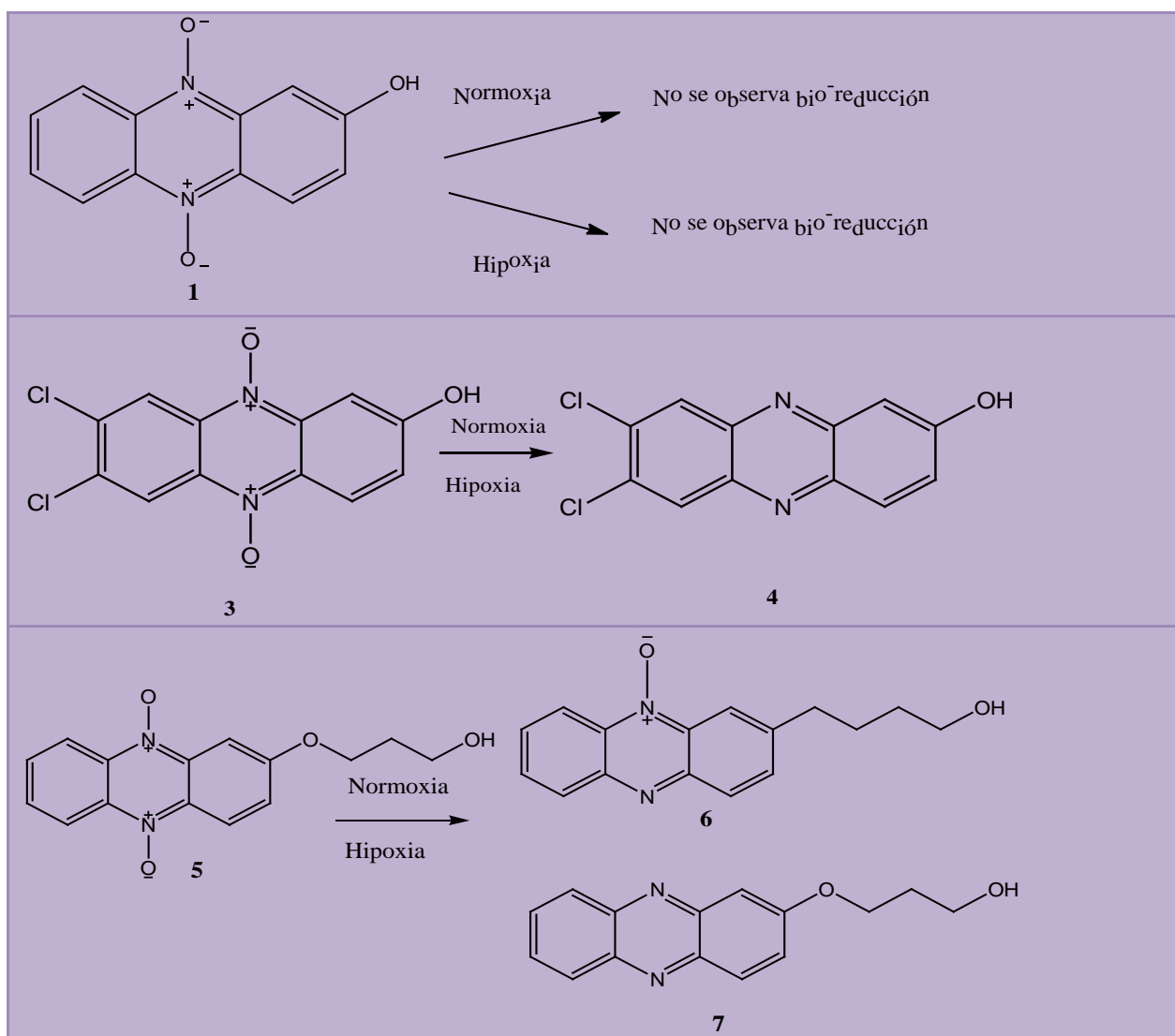
Tabla 1- Ruta sintética utilizada para la obtención de los derivados reducidos.

Para los hidroxiderivados **1**, **3**, **12** y **14** se obtiene el correspondiente derivado deoxigenado (totalmente reducido) mediante reducción química: **2**, **4**, **13** y **15**. Para los aminoderivados **8** y **10** también es posible observar los correspondientes deoxigenados: **9** y **11**. Solamente para el derivado **5**, fue posible observar la obtención de los derivados monoxidado **6** y totalmente reducido **7** (tabla1).

5.2- Evaluación de la capacidad bio-reductiva de los derivados de N,N'-dióxido de fenazina utilizando homogeneizado de hepatocitos de rata en condiciones de hipoxia y normoxia.

En esta primera etapa se eligió estudiar la capacidad bio-reductiva de derivados previamente evaluados por el grupo de investigación y derivados recientemente obtenidos.

Luego de la reducción química de los derivados de *N,N'*-dióxido de fenazina se evaluó su capacidad bio-reductiva utilizando homogeneizado de hepatocitos de rata en condiciones de hipoxia y normoxia. Los resultados obtenidos se muestran en la siguiente tabla:



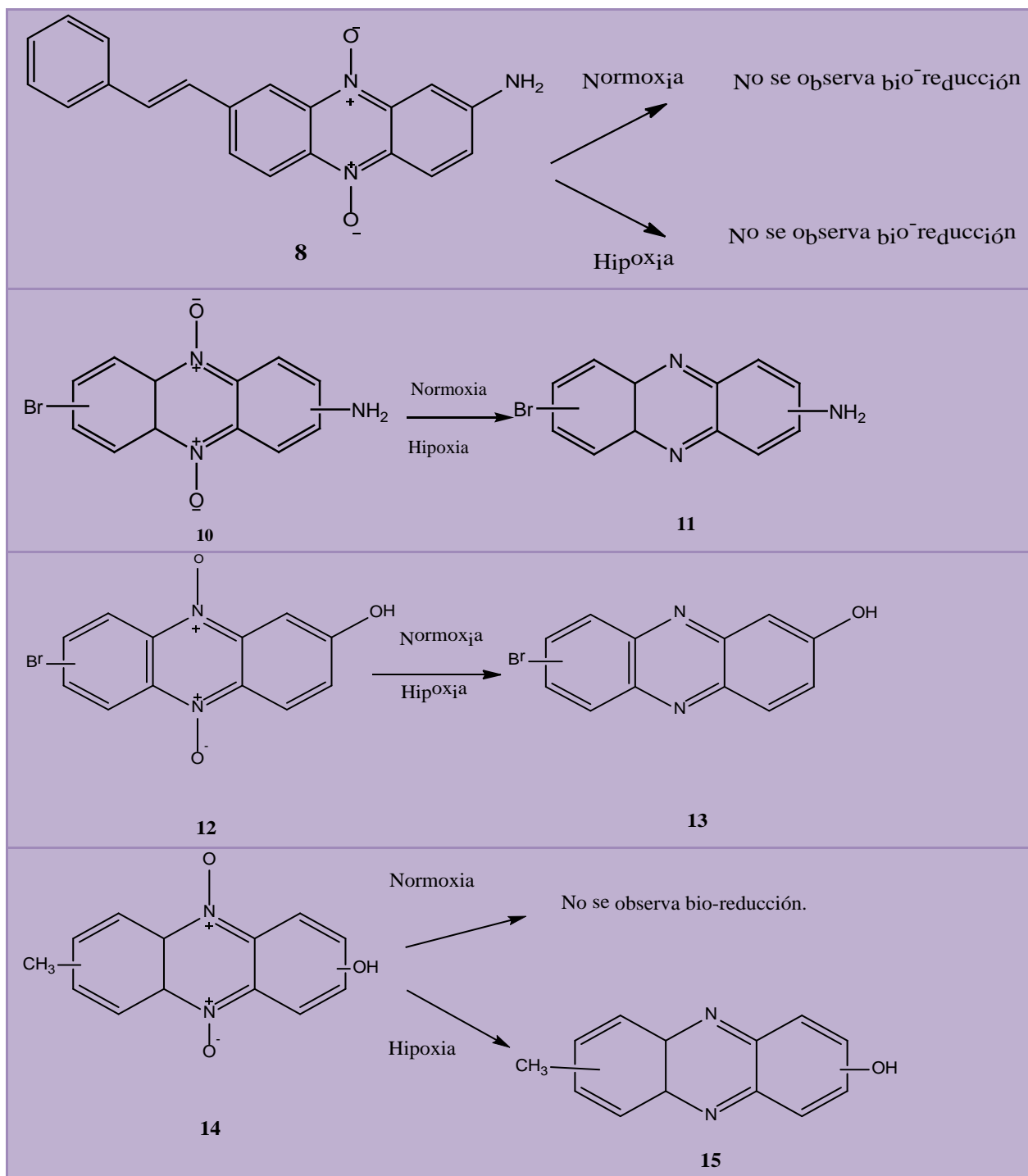


Tabla 2- Bio-reducciones en normoxia e hipoxia de los derivados de *N,N'*-dióxido de fenazina.

Se observó que el hidroxiderivado **1** y el aminoderivado **8** no son bio-reducibles en condiciones de hipoxia y normoxia. Los hidroxiderivados **3**, **10** y **12** son bio-reducibles en ambas condiciones. En el aminoderivado **5** al igual que en la reducción química se observa la obtención de los derivados monoxidado **6** y totalmente reducido **7**. El hidroxiderivado **14** no son bio-reducible en condiciones de normoxia pero si en hipoxia.

5.3- Identificación de las enzimas involucradas en la bio-reducción de los derivados de *N,N'*-dióxido de fenazina utilizando homogeneizado de hepatocitos de rata en condiciones de hipoxia y normoxia.

Previamente se identificaron algunas enzimas responsables de la bio-reducción de los compuestos. Se encontró como responsable del proceso de bio-reducción a la enzima DT-diaforasa para los compuestos **10** y **12**. Por este motivo al determinar que el compuesto **3** tenía el mismo comportamiento que los dos anteriores mencionados en el ensayo de bio-reducción se realizó el estudio de la participación de la enzima DT-diaforasa utilizando **Dicumarol** como inhibidor de su actividad, analizándose los productos formados durante la exposición de las fenazinas a la fracción citósolica (Kim *et al.*, 2004).

En este caso se preincubó la fracción con el inhibidor enzimático y se realizaron las bio-reducciones en iguales condiciones a las descritas anteriormente. Se analizaron los productos formados durante la exposición de las fenazinas a la fracción citósolica; se constató la ausencia de productos de bio-reducción en el ensayo confirmando así que la enzima DT-diaforasa estaría involucrada en la generación del producto completamente reducido del compuesto **3** en esta fracción (figura 7).

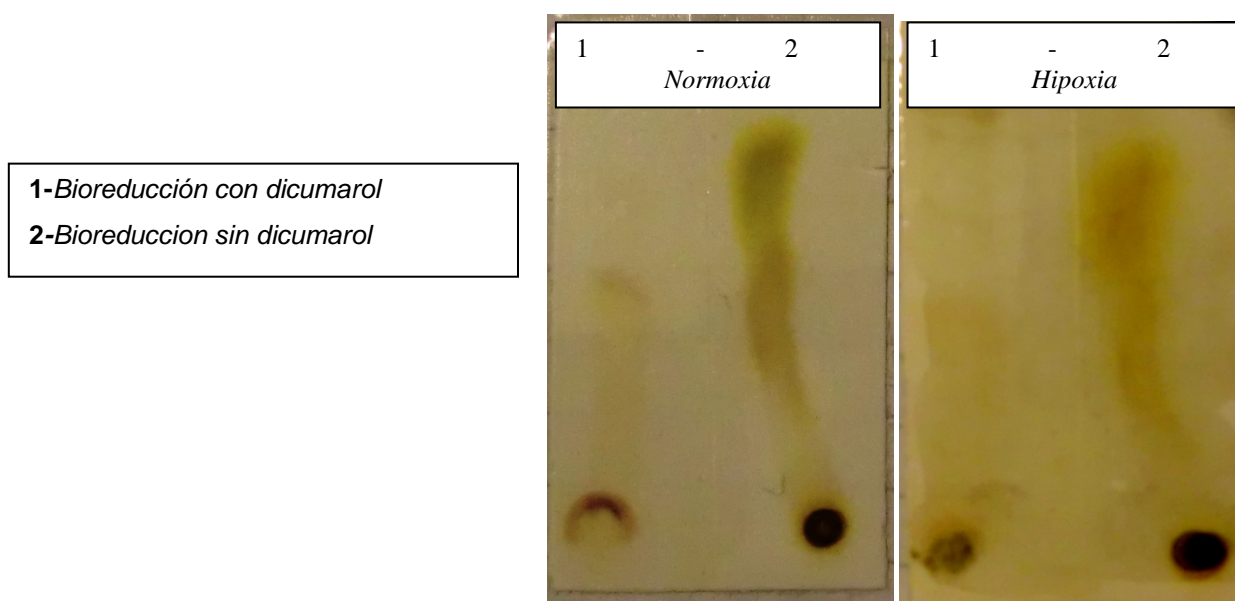


Figura 7- Cromatografía de capa fina realizada en el estudio de la participación de la enzima DT diaforasa en fracción citosólica.

5.4- Estudio de la actividad biológica de los compuestos sintetizados.

Ensayo de citotoxicidad en condiciones de normoxia en la línea celular V79.

5.4.1- Fundamento de la técnica.

Para determinadas líneas celulares es posible obtener colonias de más de 60 células sembrándolas a bajas concentraciones en placas de cultivo. Dichas colonias están conformadas por “clones” que derivan de una única célula madre, la cual se introdujo en la placa durante el sembrado. La capacidad de replicación o eficiencia clonogénica que permite la formación de dichas colonias puede verse afectada por el tratamiento con un determinado compuesto, efecto muy buscado en fármacos antitumorales. Este podría conducir a una disminución del número de colonias generadas por una determinada línea celular en determinadas condiciones de sembrado y de crecimiento. Ya que es posible contabilizar el número de colonias, se puede registrar la disminución en la eficiencia clonogénica y así determinar el porcentaje de supervivencia celular en ausencia y presencia del compuesto.

5.4.2- Eficiencia clonogénica de líneas celulares.

No todas las líneas celulares tienen capacidad para formar clones ni lo hacen con la misma eficiencia. Por ejemplo, la línea celular V79 (fibroblastos de hámster chino) tiene una eficiencia clonogénica de 98% en 7 días (Azqueta *et al.*, 2005).

5.4.3- Descripción del ensayo de clonación.

En primer lugar se realiza un ensayo de la capacidad de clonación de células sometidas a tratamiento con el compuesto a evaluar. El ensayo se efectúa en atmósfera de aire. Se utiliza una concentración inicial de 20 μ M sobre células V79 para determinar la citotoxicidad del producto. En aquellos casos en que resulte ser tóxico, se determina la relación dosis-respuesta en células V79, ensayando diferentes concentraciones de producto y determinando la fracción de supervivencia en cada caso.

Para ello se partió de un cultivo recientemente adquirido, se determinaron sus condiciones óptimas de crecimiento y se realizó un banco de trabajo para las mismas. Se determinó que la

capacidad clonogénica es óptima. Se realizaron los ensayos en las condiciones descritas a continuación.

El medio de cultivo utilizado fue DMEM líquido suplementado con un 10 % de suero fetal bovino y 1% de penicilina-estreptomicina, las células se mantenían en estufa a 37°C. Se realizaban controles al cultivo a las 12, 24 y 48 hs; si existían numerosas células muertas se procedía a centrifugar y sembrar nuevamente. Cuando el frasco de cultivo estaba ya en su capacidad máxima para mantener las células se realizaba el pasaje de células a otros frascos y se mantenían en estufa a 37°C.

5.4.4- Interpretación de resultados

- i. se calcula los clones y se calcula el promedio de 6 pocillos por placa.
- ii. se calcula la eficiencia clonogénica (PE), según:

$$PE = \frac{\text{número de colonias presentes}}{\text{número de células sembradas}} \times 100$$

- iii. se calcula la fracción de supervivencia después del tratamiento (FS), según:

$$FS = \frac{\text{PE tratamiento}}{\text{PE control negativo}} \times 100$$

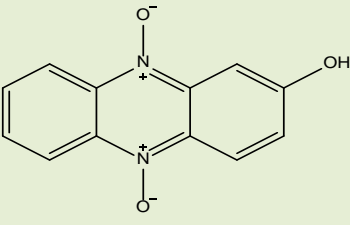
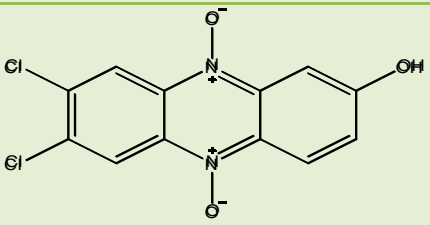
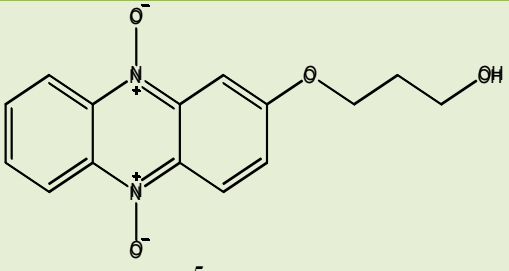
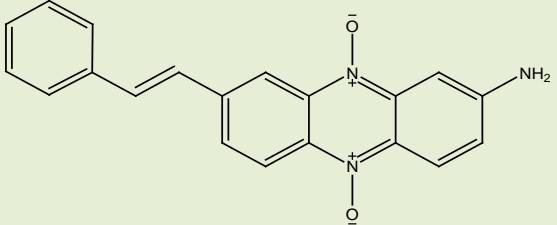
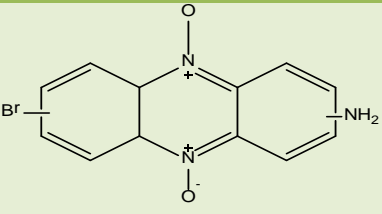
La fracción de supervivencia del control negativo se considera 100.

5.4.5-Compuestos evaluados en el ensayo de citotoxicidad.

En primer lugar se realizó la puesta a punto del ensayo de citotoxicidad en nuestro laboratorio, el cual no había sido realizado hasta el momento.

En una segunda etapa base a los resultados obtenidos en la evaluación de la capacidad bio-reductiva de los derivados de *N,N'*-dióxido de fenazina utilizando homogeneizado de hepatocitos de rata en condiciones de hipoxia y normoxia se realizó la comparación con los datos obtenidos previamente en ensayos de citotoxicidad de estos mismos compuestos los cuales se muestran en la tabla 3. (Lavaggi, 2009), (Nieves, 2011).

En la siguiente tabla se resumen los resultados de la fracción de supervivencia de los compuestos evaluados en el ensayo de citotoxicidad.

Derivados	FS(%)Normoxia	FS(%)Hipoxia
 <p>1</p>	100	73
 <p>3</p>	1	0
 <p>5</p>	100	100
 <p>8</p>	50	100
 <p>10</p>	0	0

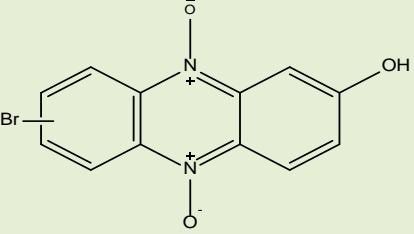
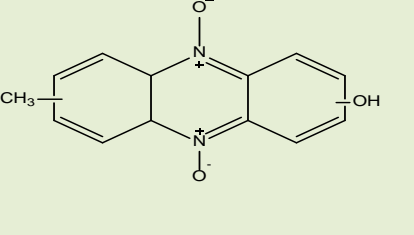
 <p style="text-align: center;">12</p>	80	0
 <p style="text-align: center;">14</p>	100	100

Tabla 3- Fracción de supervivencia (FS) en normoxia e hipoxia de las células V79.

El hidroxiderivado **1** demostró ser **inactivo** tanto en normoxia como en hipoxia con una fracción de supervivencia alta, el hidroxiderivado **3** que presenta dos átomos de cloro como sustituyentes resultó ser **activo no selectivo** en ambas condiciones. Los hidroxiderivados **5** y **14** resultaron

inactivos en las dos condiciones con una FS del 100% . El hidroxiderivado **12** presentó escasa toxicidad con una FS 80% en normoxia y elevada en hipoxia con un FS 0% mostrando ser **activo selectivo**. El aminoderivado **8** presento **actividad moderada** en normoxia con una FS del 50% e **inactividad** en hipoxia con una FS del 100%. Por último el aminoderivado **10** que además presenta un bromo en su estructura (Lavaggi, 2009), resulto ser **activo no selectivo** en ambas condiciones con una FS del 0%.

5.5- Determinación de la influencia del uso de microemulsiones en la citotoxicidad en condiciones de normoxia en la línea V79.

Para este punto se preparó un vehículo constituido por 10% de tensoactivo compuesto por Eumulgin HRE 40, oleato de sodio y fosfatidilcolina (8:6:3), 10% de fase oleosa formada por colesterol y 80% de agua destilada. Para preparar un volumen de 1 mL de vehículo se utilizó: 46 mg de Eumulgin, 36 mg de oleato de sodio, 18 mg de fosfatidilcolina, 0,1 g de colesterol y agua destilada cantidad suficiente para 1 mL. Además para control se preparo el mismo vehículo pero sin agregarle el colesterol.

Colesterol	FS%
Sin colesterol	59
Con colesterol	6

Tabla 4- *Fracción de supervivencia con el uso de microemulsiones.*

Como resultado se observó que vesículas con colesterol son más citotóxicas que las vesículas sin colesterol, pero en general ambos casos presentaron toxicidad lo que sugiere que las microemulsiones no son un buen vehículo para ser utilizadas en un estudio de evaluación biológica *in vitro* en estas condiciones.

6- Discusión

Considerando los resultados de la evaluación de la capacidad bio-reductiva de los derivados de *N,N'*-dióxido de fenazinas utilizando homogeneizado de hepatocitos de rata en condiciones de

hipoxia y normoxia recogidos en la tabla 2, se realiza una comparación con los resultados de FS de la tabla 5 obtenidos anteriormente en ensayos de citotoxicidad (Lavaggi, 2009), (Nieves, 2011).

El compuesto hidroxiderivado **1** en el ensayo de bio-reducción no fue reducido en ninguna de las condiciones (normoxia e hipoxia), hecho que coincide con los resultados de citotoxicidad donde la FS (Fracción de Supervivencia, tabla 3) es del 100 % en ambas condiciones.

El compuesto aminoderivado **8** igualmente que el primero no se bio-reduce en condiciones de normoxia e hipoxia pero cuando observamos los valores de FS encontramos que en normoxia este compuesto presenta citotoxicidad intermedia. Esto podría explicarse con la presencia del grupo amino en condiciones de normoxia donde el oxígeno está presente favoreciendo la formación de estructuras tipo quinonas que se saben son altamente electrofílicas y generan citotoxicidad. Esta teoría es plausible además cuando observamos los valores de FS en hipoxia donde este compuesto no presente citotoxicidad en ausencia de oxígeno.

El aminoderivado **10** en el ensayo de bio-reducción resulto ser no selectivo reduciéndose en ambas condiciones coincidiendo así con el ensayo de citotoxicidad donde la FS en normoxia e hipoxia fue de 0% demostrando ser activo y citotóxico en ambas condiciones.

Los hidroxiderivados **3** y **12** como ya se dijo anteriormente se bio-reducen en ambas condiciones; cuando se observan los valores de FS el derivado **3** es citotóxico en ambas condiciones pero para el derivado **12** los valores de FS en normoxia son de un 80% mientras que en hipoxia FS 0%, esto podría indicar que si bien ambos compuestos son bio-reducibles, los mecanismos de acción de cada derivado asociado a la citotoxicidad son diferentes.

El derivado O-sustituído **5** en el ensayo de bio-reducción generó un derivado monoxidado y otro totalmente reducido, sin embargo en el ensayo de citotoxicidad resulto ser no tóxico con una FS del 100% en ambas condiciones ensayadas. Por lo que el proceso de bio-reducción no generaría especies citotóxicas en ninguna de las condiciones ensayadas.

El hidroxiderivado **14** se reduce solamente en condiciones de hipoxia en el ensayo de bio-reducción. Sin embargo en el ensayo de citotoxicidad no presenta citotoxicidad en ninguna de las condiciones, por lo que el proceso de bio-reducción en este caso no está asociado a la citotoxicidad.

7-Conclusiones y perspectivas

- Se obtuvieron productos deoxigenados, utilizando ditionito de sodio como agente reductor; posteriormente usados como patrón en el ensayo de evaluación de la capacidad bio-reductiva de los derivados de N,N'-dióxido de fenazina.
- A partir de los valores obtenidos en el ensayo de bio-reducción y el ensayo de citotoxicidad en normoxia/hipoxia, no se concluye que exista una clara correlación entre el proceso de bio-reducción y la citotoxicidad en condiciones de normoxia e hipoxia.
- En el ensayo de bio-reducción se observó que el compuesto **14** (hidroxiderivado) es selectivo en hipoxia sin embargo resulto ser **no tóxico** en el ensayo de citotoxicidad tanto en condiciones de normoxia como de hipoxia. Este derivado es candidato a futuras modificaciones estructurales que permitan obtener el perfil de actividad biológica deseado
- A su vez los aminoderivados **8** y **10** resultaron citotóxicos, en condiciones de normoxia. Sin embargo se podría continuar trabajando con estos derivados modulando su actividad biológica hacia derivados con mayor grado de selectividad.
- Se ha identificado que la DT-diaforasa involucrada en el proceso de bio-reducción es selectiva en las diferentes condiciones de gasificación, normoxia e hipoxia.
- Las microemulsiones resultaron ser tóxicas por sí solas, siendo de toxicidad media la microemulsión sin colesterol y muy tóxica la microemulsión con colesterol.

8-Bibliografía

- Alberts, B.; Bray, D.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Watson, J., 2004. "Molecular biology of the cell" 4a. ed. Estados Unidos, Garland Science, 2004.
- Azqueta, A.; Pachón, G.; Cascante, M.; Creppy, E.; Monge, A.; López de Ceráin, A. 2005. Selective toxicity of a quinoxaline 1,4-di-N-oxide derivative in human tumor cell lines *Arzneimittelforschung-Drug Research*. 55, 177-182.
- Brown, J. (1999) "The hypoxic cell: A target for selective cancer therapy". *Cancer Research*, 59, 5863–5870.
- 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. *Archiv der Pharmazie*. 333, 387-393.
- 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.

- 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.
- Cerecetto H, González M, Lavaggi ML, Azqueta A, Ezpeleta O, López de Ceraín A, Monge-Vega A. 2005. Phenazine 5,10-dioxide derivatives as hypoxic selective cytotoxins. *J. Med. Chem.* P 48, 21.
- Cerecetto H, González M, Lavaggi M.L, Aravena M.A, Rigol C, Olea-Azar C, Azqueta A, López de Ceraín A, Monge A, Bruno A.M. 2006. Phenazine 5,10-Dioxide derivatives as hypoxic selective cytotoxins. Part II. Structure-activity relationship studies. *Med. Chem.* P 2, 511.
- Comisión Honoraria de Lucha contra el cáncer. Informe Anual 2009. www.comisioncancer.org.uy
- Correa, M.A. *Incorporação de naproxeno em sistema microemulsionado: liberação in vitro e avaliação biológica*. São Paulo, 1996. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Dalmora, M.E.A.; Dalmora, S.L.; Olivera, A.G. 2001. Inclusion complex of piroxicam with β -cyclodextrin and incorporation in cationic microemulsion. In vitro drug release and in vivo topical anti-inflammatory effect. *Int. J. Pharm.*, v.222, p.45-55.
- De Vita, V.T.; Lawrence, T.S.; Rosenberg, S.A. 2008. "Cancer. Principles and practice of oncology". Volúmen 1. 8a. ed. Filadelfia, Lippincott Williams and Wilkins, p 315-318.
- Formariz, T.P.; Chiavacci, L.A.; Scarpa, M.V.; Silva-Junior, A.A.; Egito, E.S.T.; Terrugi, C.H.B.; Franzini, C.M.; Sarmiento, V.H.V.; Oliveira, A.G. 2010. Structure and viscoelastic behavior of pharmaceutical biocompatible anionic microemulsions containing the antitumoral drug compound doxorubicin. *Colloids Surf. B.*, v.77, p.47-53.
- Garti, N.; Aserin, A. Pharmaceutical emulsions, double emulsion and microemulsion. In *Drugs and the pharmaceutical sciences*. New York: Mar Dekker, 1996. v. 73, cap. 15, p.412-519.
- Haddadin, M.J.; Issidorides, C.H. 1965. Enamines with isobenzofuroxan: A novel synthesis of quinoxaline-di-N-oxides. *Tetrahedron Letters*. 36, 3253-3256.
- Hellman, S. 2008. Principios para el manejo del cáncer: radioterapia, en *Cáncer; principios y práctica de oncología*. Volúmen 1. 8a. ed. Lippincott Williams and Wilkins, Filadelfia.
- Hosoda S., Nakamura W. And Hayashi K. 1974. Properties and reaction mechanism of DT-diaphorase from rat liver. *J. Biol. Chem.* 249; 6416-6423.
- Kim MS, Blake M, Baek JH, Kohlhagen G, Pommier Y, Carrier F. 2003. Inhibition of Histone Deacetylase Increases Cytotoxicity to Anticancer Drugs Targeting DNA *Cancer Res.* P 63,7291.

- Kim, J.Y.; Patterson, A.V.; Stratford I.J.; Hendry J.H.; 2004. The importance of DT-diaphorase and hypoxia in the cytotoxicity of RH1 in human breast and non-small cell lung cancer cell lines. *Anticancer Drugs* 15,71-77.
- Lavaggi, M.; Cabrera, M.; Cerecetto, H.; González, M. 2008. Differential enzymatic reductions governing the differential hypoxia-selective cytotoxicities of phenazine 5,10-dioxides. *Chem Res Toxicol.* P 21, 1900.
- Lavaggi, M. 2009. "Hipoxia como Diana Terapéutica para el Tratamiento de Tumores Sólidos: Desarrollo de Profármacos Selectivos de N, N'-dióxido de Fenazina". Tesis de posgrado en Química, p. 49-50.
- Lin AJ, Cosby LA, Shansky CW and Sartorelli AC..1972. Potential bioreductive alkylating agents. Benzoquinone derivatives. *J. Med. Chem.*, 15, 1247-1252.
- Maranhao, R.C., Graziani, S.R., Yamaguchi, N., Melo, R.F., Latrilha, M.C., Rodrigues, D.G., Couto, R.D., Schreier, S., Buzaid, A.C.2002. Association of carmustine with a lipid emulsion: in vitro, in vivo and preliminary studies in cancer patients. *Cancer Chemoter. Pharmacol.*, v.49, p.487-498.
- 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.
- Metzen, E.2007. "Enzyme substrate recognition, in oxygen sensing: How the HIF trap snaps?" , *Biochemical Journal*, 408, e5-e9.
- 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.
- 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. Structure-activity relationships. *Pharmazie.* 53, 698-702.
- Nieves, M. 2011. " Derivados de N,N'-dióxido de fenazina como agentes bio-reducibles en hipoxia que interaccionan con ADN", Tesis de graduación, p. 35-38.
- Rosenberg, (2008). "Cancer. Principles and practice of oncology". Volúmen 1. 8a. ed. Filadelfia, Lippincott Williams and Wilkins.
- Ross, D; Beall, HD; Siegel, D; Traver, RD; Gustafson, DL. 1996. "Enzymology of bioreductive drug activation; *British Journal of Cancer.*
- Schwarz J, Yarbo J. 2008. Scientific basis of cancer chemotherapy, en *The chemotherapy source book.*

- Sim, B.; Hicks, K.; Pullen, S.; van Ziji, P. Denny, W.; Wilson, W. 2000. Comparison of aromatic and tertiary amine N-oxides of acridine DNA intercalators as bioreductive drugs. Cytotoxicity, DNA binding, cellular uptake, and metabolism. *Biochemical Pharmacology*. 69, 969-978.
- P. Vaupel, A. Mayer. 2007. Hypoxia in cancer: significance and impact on clinical outcome, *Cancer Metastasis Rev.* 26, 225–239.