

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

Facultad de Ciencias
Licenciatura en Bioquímica
Tesina de graduación

DESARROLLO Y EVALUACIÓN BIOLÓGICA DE PROFÁRMACOS SENSIBILIZADORES PARA CÉLULAS TUMORALES



FACULTAD DE
CIENCIAS
UDELAR fcien.edu.uy

MAIRA DE NEGRI
ORIENTADORA: DRA. MARIA LAURA LAVAGGI
CO-ORIENTADORA: DRA. PAOLA HERNANDEZ
DICIEMBRE 2015



Índice

Introducción.....	6
Generalidades y bases moleculares del cáncer	6
Indicencia	8
Quimioterapia e Hipoxia tumoral Quimioterapia	8
Hipoxia tumoral	9
Profármacos bio-reducibles	11
Sensibilizadores.....	12
Inhibidores de desacetilasas de histonas (HDACs)	12
Antecedentes	16
Objetivos	19
Materiales y métodos	20
Síntesis	20
Síntesis de derivados de benzofuroxano	20
Síntesis de los derivados 1-4 de <i>N,N'</i> -dióxido de 2- aminometilmetoxifenazina	20
Síntesis del derivado 5 de <i>N,N'</i> -dióxido de 2- aminometiletoxifenazina.....	23
Síntesis de los derivados 6-9 de <i>N, N'</i> -dióxido de 2- aminoguanidilfenazina	23
Ensayos biológicos	24
Actividad citotóxica y antiproliferativa	24
Determinación de los niveles de histona acetilada mediante Western blot.....	24
Síntesis química: resultados y discusión.....	27
Síntesis de benzofuroxanos.	29
Síntesis de los derivados 1-4 de <i>N,N'</i> -dióxido de 2- aminometilmetoxifenazina	29
Análisis espectroscópico	31
Síntesis del derivado 5 de <i>N,N'</i> -dióxido de 2-aminometiletoxifenazina	37
Síntesis de los derivados 6-9 de <i>N,N'</i> -dióxido de 2-aminoguanidilfenazina	37
Resultados y discusión Evaluación biológica.....	38
Fundamento de la técnica de MTT	38
Citotoxicidad en V79	38
Actividad antiproliferativa en U-2 OS	39
Discusión	41
Fundamento de la técnica 2: Western blot	42

Discusión	44
Conclusiones	45
Perspectivas	46
Bibliografía.....	47

Hoy nuestra capacidad de creación tecnológica es muy insuficiente, como resultado de un histórico proceso de dependencia. Así, nuestras investigaciones están a cargo de científicos y técnicos formados según los modelos teóricos del mundo industrializado. Su trabajo se inspira más en las realidades y necesidades de este último que en las suyas. Y cada vez con mayor frecuencia, miles de científicos y profesionales abandonan sus patrias para servir en los países opulentos; exportamos ideas y personas capacitadas; importamos tecnología y dependencia.

Salvador Allende, Discurso de inauguración de UNCTAD III (1972)

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecer a mi familia, por apoyarme siempre y creer en mí; sobre todo a vos mamá, que fuiste más importante de lo que pude demostrar en este proceso.

A mis tutoras María Laura y Paola, por las enseñanzas, paciencia y disposición sin importar días ni horarios.

A Hugo Cerecetto y Wilner Martinez, por permitirme realizar el trabajo especial en sus laboratorios.

A mis compañeras de orgánica, Rosina, Lucía, Mariana y Elena, por hacer más divertido el laboratorio, y enseñarme y ayudarme cada vez que lo necesité, gracias.

A mis amiga y compañera de laboratorio Sai, por su buen humor, por enseñarme y alentarme siempre.

A mis amigos, los de siempre y los que tuve suerte de conocer en facultad, más que nada a Florencia, por no cansarse de mis preguntas y estar siempre dispuesta a compartir y ayudar a los demás .

A Todos los amigos que no nombro pero llevo conmigo siempre.

¡Gracias!

“La investigación que da origen a los resultados presentados en la presente publicación recibió fondos de la Agencia Nacional de Investigación e Innovación bajo el código INI_X_2013_1_101149”

Introducción

Generalidades y bases moleculares del cáncer

El cuerpo de los animales funciona como una sociedad. Las células se reproducen por división celular y se organizan en conjuntos formando tejidos. Dichas células se encuentran comprometidas a colaborar entre sí, recibiendo, emitiendo e interpretando señales que actúan como controles y les indican de qué manera deben actuar. Las alteraciones moleculares que rompan esta importante armonía, pueden desencadenar enfermedades.¹

El cuerpo humano está conformado por más de 10^{14} células. Cada día, millones sufren mutaciones y distorsionan de manera potencial los controles impuestos. Sin embargo, muchas son mutaciones silenciosas o controladas por la maquinaria de reparación del ADN; otras pueden causar en las células ventajas selectivas permitiendo que una se divida más vigorosamente que el resto y esto, es justamente lo que caracteriza al cáncer, una enfermedad en la que los clones de células mutantes empiezan a prosperar a expensas de las adyacentes, terminando en la destrucción de la sociedad celular.¹

Las características de las células cancerosas son, que se reproducen a pesar de las restricciones impuestas en condiciones normales y, que invaden y colonizan otros tejidos y órganos. Cuando una célula crece anormalmente forma una masa celular llamada neoplasma. La misma puede ser benigna: no se convierte en invasora, o maligna si sus células son capaces de invadir otros tejidos, lo cual lleva a la formación de tumores secundarios o metástasis. Por lo mismo, los tumores sólo se consideran cancerosos si son malignos.²

El cáncer es considerado, en esencia, una enfermedad genética. La acumulación de alteraciones genéticas en el genoma de las células somáticas es la base de la progresión del tumor (**Figura 1**). En los últimos años, la disponibilidad y el progreso de tecnologías de secuenciación del genoma humano han mejorado drásticamente el conocimiento de esta enfermedad. Se ha demostrado que la formación de tumores sólidos requiere de la acumulación de mutaciones y eventos genéticos, proceso que puede demorar décadas, y por lo tanto, ofrece una increíble oportunidad para la detección temprana de la enfermedad y posterior tratamiento.³

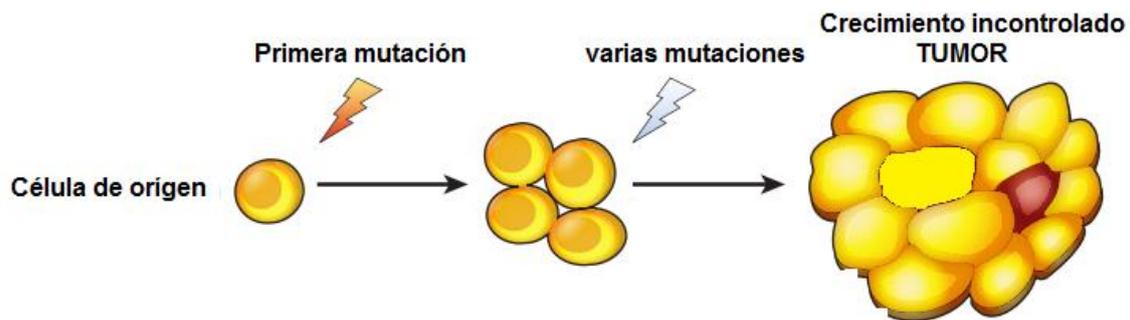


Figura 1. Formación del tumor a partir de una célula de origen por acumulación de mutaciones. Extraída de ⁵.

Los genes responsables del desarrollo y detención del cáncer se conocen como oncogenes y genes supresores de tumores. La función de los genes supresores de tumores es inhibir la tumorigénesis; los mismos codifican para proteínas que se encuentran regulando distintos puntos del ciclo celular, impidiendo su progresión si las condiciones no son adecuadas. Cuando se producen mutaciones en éstos, las células son incapaces de detener la progresión del ciclo celular, dando lugar a la aparición de nuevas mutaciones y consecuente posibilidad de desarrollo de tumores. Las mutaciones pueden ser de cualquier tipo y se caracterizan por ser de pérdida de función y no encontrarse localizadas en sitios específicos de los genes. En contraste, los oncogenes se producen por mutaciones de ganancia de función de protooncogenes y suelen estar localizadas en sitios específicos de los mismos; se caracterizan por ser mutaciones puntuales -casi siempre de cambio de sentido (*missense*)- y suelen afectar sólo un alelo, haciéndolo heterocigoto. Los mismos codifican para proteínas que actúan en procesos de crecimiento y proliferación y se encuentran sobreexpresados.⁵

Antes de la revolución genómica, los tumores eran clasificados según tres criterios: (i) su localización o sitio primario de origen, distinguiéndose por ejemplo en: cáncer de próstata, mama, pulmón. (ii) Según el tipo de tejido del cual derivan, encontrando carcinomas de tejido epitelial, sarcomas de tejido conectivo, linfomas de tejido linfático, etc. (iii) Según su apariencia, es decir, el grado histológico. Descripción basada en cuan diferenciadas se encuentran las células tumorales, correspondiendo los grados más bajos a aquellos tumores en donde las células se encuentran más diferenciadas y los más altos, al mayor grado de indiferenciación. Estos criterios eran usualmente utilizados como determinantes primarios para el pronóstico y posterior establecimiento del mejor tratamiento.⁵ Sin embargo, se ha visto que tumores con características histopatológicas similares, presentan diferentes respuestas clínicas y frente a la terapia.⁶

Es cada vez más evidente que la frecuencia y distribución de mutaciones que afecta a los genes del cáncer, puede ser utilizada para redefinir la taxonomía basada en histología de un tipo de tumor determinado.⁵ Las diferencias en la genética individual de cada tumor, influyen en el poder metastásico, lo cual hace necesaria la búsqueda de

tratamientos específicos. El mayor objetivo de la incorporación de la genética del cáncer en los tratamientos clínicos, es la medicina personalizada, es decir, estrategias terapéuticas basadas en la taxonomía molecular de los tumores para cada paciente.⁷

Indicencia

El cáncer es la segunda causa más común de mortalidad en el mundo, luego de las enfermedades cardiovasculares.⁸ En el 2012 se registraron 14 millones de nuevos casos y 8.2 millones de muertes relacionadas a cáncer. Asimismo, se prevé que en los próximos 20 años la incidencia aumente un 70 %.⁹

De momento, las terapias convencionales como cirugía, quimioterapia y radioterapia continúan siendo poco selectivas respecto a células normales e ineficientes en casos de metástasis. Sin embargo, los crecientes conocimientos sobre la biología del cáncer están siendo útiles en nuevas búsquedas de formas de prevención, así como en tratamiento y diagnóstico, como se ha comentado anteriormente.¹

En Uruguay, la última actualización disponible en el Registro Nacional de Cáncer (2010) indica sobre el total de las muertes por año, 23.8 % debidas a cáncer.¹⁰

En la **figura 2** puede observarse la incidencia y mortalidad de los tipos de cáncer más comunes, tanto para hombres como mujeres en Uruguay desde el año 2007 al 2011, siendo el cáncer de mama el de mayor incidencia en mujeres y los de próstata y pulmón en hombres. La tasa se encuentra ajustada por edad a la población mundial estándar.¹⁰

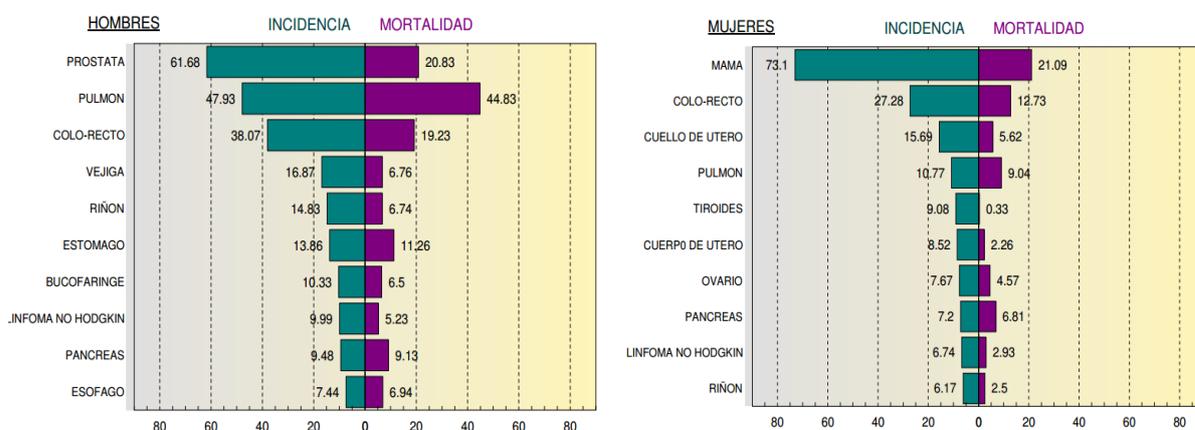


Figura 2. Incidencia y mortalidad del cáncer en Uruguay en hombres y mujeres entre el 2007 y 2011. Extraído de ¹⁰.

Quimioterapia e Hipoxia tumoral

Quimioterapia

El desarrollo de la quimioterapia surge en la década del 50 como una estrategia terapéutica para pacientes con malignidades hematológicas y diferentes tipos de tumores sólidos. Se utiliza (i) en casos de cáncer avanzado donde no existe otro tratamiento posible, (ii) para pacientes en los que la enfermedad se encuentra localizada de forma tal que es imposible utilizar otras estrategias terapéuticas como cirugía o radioterapia y, (iii) en combinación con otras terapias como cirugía y radioterapia.¹¹

Algunos quimioterápicos pueden tener como blanco distintas fases del ciclo celular con el fin de interferir en el crecimiento o división de la célula, llevando a la muerte de la misma. Otros a su vez, tienen como blanco la síntesis o replicación del ADN. Los efectos adversos de esta terapia tradicional son el resultado la falta de especificidad de los mismos por células tumorales.¹²

El cisplatino (**figura 3**), es un compuesto inorgánico simple; su acción antiproliferativa fue descubierta en 1965 y fue evaluado hasta ser aprobado como fármaco con actividad antitumoral en 1978.

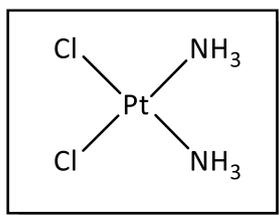


Figura 3. Estructura del cisplatino.

Es uno de los agentes anticancerígenos más efectivos en quimioterapia, la tasa global de curación se acerca al 90 % en los primeros estadios de la enfermedad. Es indicado para el tratamiento de cáncer cervical, de cabeza, cuello, y pulmón. Sin embargo, su administración está obstaculizada debido su toxicidad, siendo alguna de sus manifestaciones: nefrotoxicidad, neurotoxicidad, mielotoxicidad; por los efectos gastrointestinales provocados, y la resistencia de las células al cisplatino. Una vez dentro de la célula, en el núcleo, el cisplatino se convierte en las especies $[Pt(NH_3)_2Cl(OH_2)]^+$ y $[Pt(NH_3)_2(OH_2)_2]^+$, capaces de reaccionar con el ADN.¹³ Su mecanismo de acción se basa en la formación de aductos con el ADN por la unión covalente del platino con el N₇ de residuos de purinas, lo cuales pueden formar uniones inter o intracatenarias, alterando de ésta manera la estructura de las hélices del ADN a las cuales se encuentra unido.¹⁴

Hipoxia tumoral

A diferencia de los tejidos normales, que se encuentran adecuadamente irrigados, el microambiente de los tumores sólidos es heterogéneo y, debido no sólo a la proliferación celular desmedida, sino también a la estructura anormal de la nueva vasculatura formada, los mismos presentan regiones con diferente grado de oxigenación y zonas de difícil acceso a nutrientes, distinguiéndose regiones pobremente oxigenadas o hipóxicas y regiones necróticas (**figura 4**).^{15,16,17,18,19} Las células cancerosas se han adaptado para poder sobrevivir en condiciones de hipoxia.

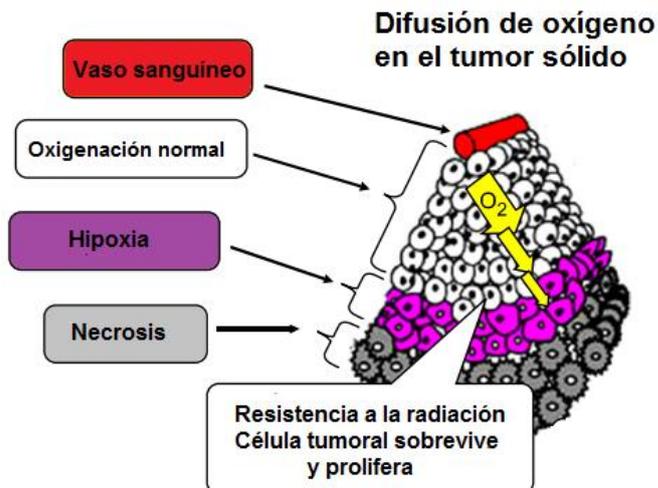


Figura 4. Difusión del oxígeno en el tumor sólido. Se puede distinguir una región de oxigenación normal, próxima a los vasos sanguíneos. Una hipóxica, de oxigenación insuficiente y otra necrótica, carente de oxígeno.

La hipoxia induce cambios en el perfil de la expresión génica a través de la inducción de factores de transcripción, llamados factores inducibles por hipoxia, HIF-1. Esta proteína activa la transcripción de genes involucrados en la progresión del tumor, angiogénesis, supervivencia celular, metabolismo de glucosa e invasión. HIF-1 es una proteína heterodimérica que consiste en dos subunidades HIF-1 α y HIF-1 β . HIF-1 α , se encuentra regulada por la concentración de oxígeno. En hipoxia, se estabiliza la expresión de HIF-1 α y la misma es translocada al núcleo donde se dimeriza con HIF-1 β ,³ y se unen a secuencias de ADN específicas, conocidas como elementos de respuesta a la hipoxia (HRE).^{20, 21}

Las células hipóxicas son resistentes a la quimioterapia. En primer lugar, la biodisponibilidad de fármacos en las áreas hipóxicas se ve afectada, ya que se encuentran menos irrigadas. En segundo lugar, algunos quimioterápicos requieren oxígeno para generar radicales libres citotóxicos. Por último, la hipoxia induce adaptaciones celulares que comprometen la efectividad de la quimioterapia: las células hipóxicas tienen menor tasa de crecimiento y los quimioterápicos suelen tener como blanco células en alta tasa de proliferación²¹, a su vez, debido a su baja selectividad afectan a las células de rápida proliferación o en división sanas, como ser las células de la sangre, linfáticas y de los folículos capilares, volviéndose inadecuadas como terapias de uso prolongado.²²

La hipoxia ofrece una atractiva diferencia entre las células normales y las tumorales que puede ser aprovechada para la obtención de fármacos selectivos, dirigidos a blancos específicos de células hipóxicas.¹⁵ Esto ha llevado al desarrollo de un grupo especial de agentes citotóxicos conocidos como citotoxinas selectivas en hipoxia o profármacos bio-reducibles. Los mismos, son compuestos inactivos *per se*, que se reducen química o enzimáticamente *in vivo* a un fármaco citotóxico, siendo ésta situación revertida en presencia de oxígeno.¹⁶

Profármacos bio-reducibles

Como se ha mencionado anteriormente, los profármacos bio-reducibles, se activan mediante una reacción de reducción, convirtiéndose en fármacos citotóxicos. Esta reacción puede llevarse a cabo sólo en regiones hipóxicas, lo cual los vuelve selectivos. En estas zonas hay sobreexpresión de diferentes enzimas reductoras dependiendo del tipo de tejido, por ejemplo citocromo P450, DT-diaforasa, xantino oxidasa. El oxígeno molecular revierte el proceso bio-reductivo en los tejidos normalmente oxigenados.

Muchos compuestos de estructura química diversa incluidos derivados de quinonas, nitroimidazoles, nitro derivados y heterociclos que contienen *N*-óxidos, han sido designados como citotoxinas selectivas para hipoxia.^{15,16,17,18} *N*-óxido es un grupo funcional en el que un átomo de oxígeno se une al par de electrones desapareados de un átomo de nitrógeno. Se encuentra presente en compuestos tales como *N*-óxido de nitronas, *N*-óxido de aminas terciarias y *N*-óxido de nitrilos.²³ El mecanismo de citotoxicidad se da mediante activación reductiva que puede involucrar uno o dos electrones (**figura 7**), vía un proceso enzimático o no, produciendo diferentes tipos de eventos citotóxicos.²⁴

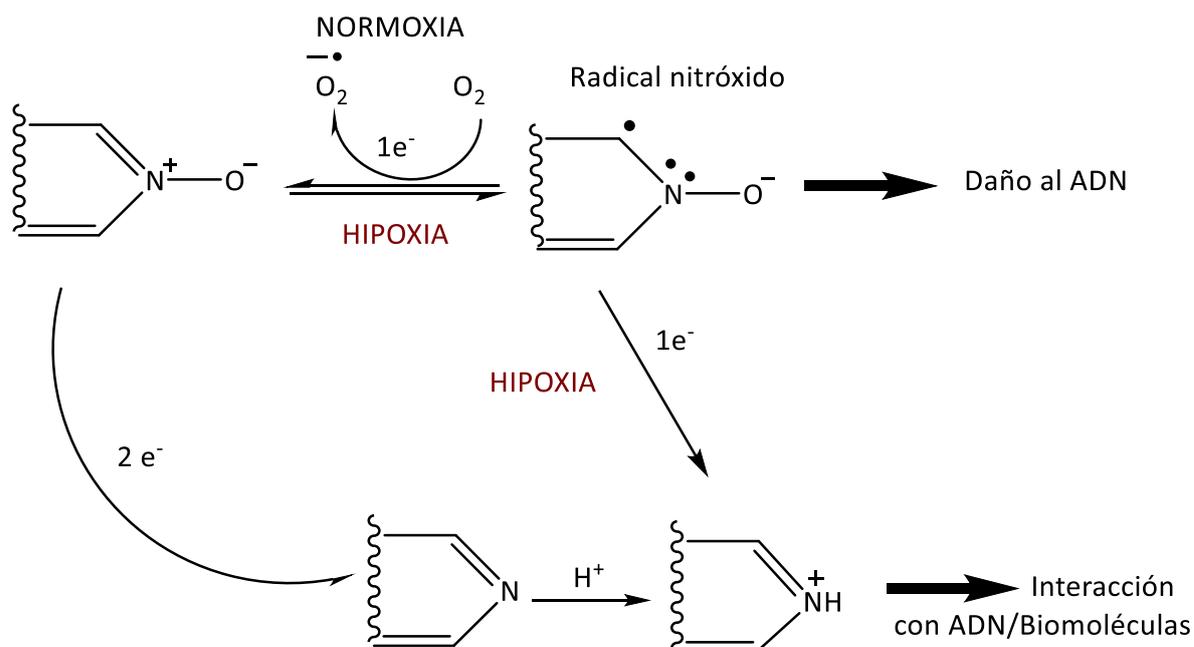


Figura 7. Bio-reducción de derivados de *N*-óxidos.

Como se observa en la **figura 7**, cuando el mecanismo de bio-reducción involucra un electrón, se genera un radical nitróxido, capaz de generar daño al ADN a través de ruptura de hebras seguido de entrecruzamientos, revirtiéndose el proceso en presencia de oxígeno.²⁵ La bio-reducción del profármaco vía dos electrones genera una amina aromática que es protonada a pH fisiológico, proceso que se ve favorecido por ser más bajo el pH en células tumorales. Con la amina protonada, la molécula adquiere carga positiva, aumentando su afinidad por el ADN, cargado negativamente debido a sus grupos

fosfato; además de provocar un incremento de lipofilia que le permite atravesar la bicapa lipídica de las células.¹⁸

Sensibilizadores

Los avances en biología molecular y celular, han permitido que los enfoques tradicionales de la terapia oncológica se encuentren en vías de ser reemplazados por estrategias innovadoras. Un ejemplo de esto son los protectores y sensibilizadores a agentes quimioterápicos.²⁶

Los agentes anticancerígenos que presentan como blanco al ADN, es decir, los compuestos genotóxicos, son los más utilizados para el tratamiento de tumores. Dentro de esta clasificación se encuentra el cisplatino, mencionado anteriormente. Desafortunadamente, los agentes genotóxicos pueden inducir efectos secundarios severos en los pacientes e incluso dañar otros tejidos. Actualmente, se han realizado esfuerzos por encontrar agentes que incrementen la potencialidad de los compuestos genotóxicos selectivamente hacia células cancerígenas, de manera que la dosis utilizada pueda ser menor, reduciendo así, los efectos secundarios o, si los efectos secundarios no fuesen el problema, aumentando la eficiencia. A éstos agentes, se los denomina sensibilizadores.²⁷

Teóricamente, los sensibilizadores difieren de los agentes anticancerígenos en que no se busca que los mismos sean citotóxicos, la característica crítica de éstos es la selectividad hacia las células tumorales. Un agente sin selectividad, que potencie efectos iguales en tejidos normales y tumorales, probablemente no será de valor.²⁶

Existen varios compuestos que pueden selectivamente sensibilizar células cancerígenas para incrementar la eficacia de los compuestos genotóxicos²⁷, entre estos se encuentra el flavopodorol, el cual es derivado semisintético de rohitukina, un alcaloide de origen natural; el mismo es inhibidor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y de la proteína quinasa A (PKA). Su mayor mecanismo de acción se da a través del efecto inhibitorio en las ciclinas dependientes de quinasas, ya que la división celular es estrechamente controlada por éstas.²⁸ Muchos otros compuestos se encuentran en diferentes fases clínicas, algunos son polipéptidos, como el ADD70, que deriva del factor de inducción de la apoptosis.²⁷

Inhibidores de desacetilasas de histonas (HDACs)

Las desacetilasas de histonas (HDACs) son enzimas que remueven grupos acetilo de los residuos de lisina de las histonas, lo que lleva al aumento de la cantidad de cargas positivas en éstas y les permite interactuar con grupos fosfato del ADN cargados negativamente, conllevando a la condensación de la cromatina e impidiéndose la transcripción²⁹ (**Figura 5**).

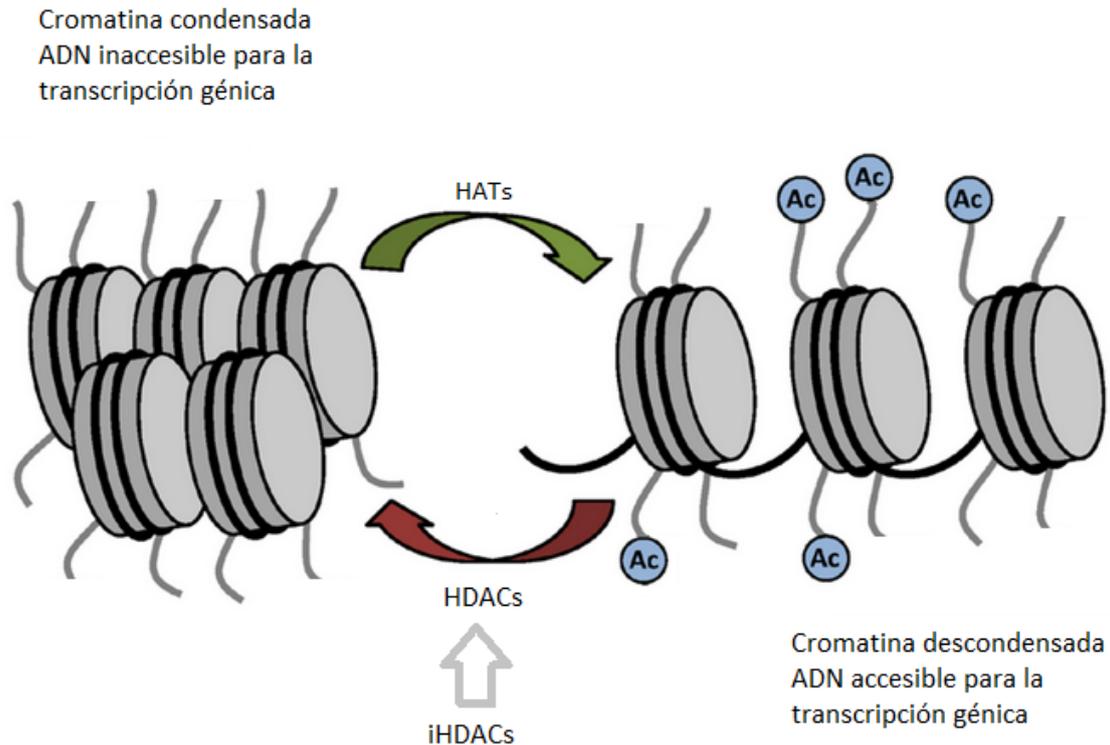


Figura 5. La acción de las HDACs genera la condensación de la cromatina que vuelve inaccesible al ADN para la transcripción génica. Los iHDACs inhiben este proceso dejando la cromatina relajada. Extraída de ³⁰.

Se ha establecido que el remodelado de la cromatina contribuye en el desarrollo y progresión tumoral debido a que alteraciones en la estructura de la misma, conduce a alteraciones en la expresión génica.³¹ Las HDACs se pueden dividir en 4 clases, la clase I (HDACs 1, 2, 3 y 8), clase II (clase IIa: HDAC 4, 5, 7 Y 9; clase IIb: HDAC 6 y 10), clase III (SIRT 1-7) y clase IV (HDAC 11). Las HDACs de clase I, II y IV comparten homología estructural y de secuencia, y requieren zinc para su actividad catalítica, mientras que las de clase III requieren NAD⁺.³² Recientemente se ha determinado que algunas de las HDACs de clase II como HDAC7, HDAC4 y HDAC5 interactúan directamente con HIF-1 en condiciones de hipoxia, por lo que podrían ser blanco para el tratamiento de tumores sólidos.³³

Los inhibidores de desacetilasas de histonas (iHDACs) pueden inducir la muerte celular por la detención del ciclo celular, inhibición de la angiogénesis y alteración de proteínas que interaccionan con las HDACs. Este efecto no se observa en las células normales, lo que ha llevado al desarrollo de iHDACs como fármacos antitumorales para terapias contra el cáncer.³⁴ No obstante, la combinación de los mismos con otras terapias podría resultar en un tratamiento más efectivo ya que, se ha demostrado que los iHDACs en combinación con compuestos funcional y estructuralmente distintos, sinergizan la acción antitumoral.^{35, 36, 37}

Los iHDACs se conforman por un agrupamiento hidrofóbico apolar, un grupo quelante de zinc y una cadena alifática como linker entre estos (**figura 6**).³⁸ Muchos se encuentran en fases clínicas de experimentación, como ser compuestos derivados de ácidos hidroxámicos y carboxílicos (fase I/II/III), benzamidas (fase I/II), péptidos cíclicos (fase I/II) y ácidos grasos de cadena corta (fase I/II).³⁹ Dentro de los ácidos hidroxámicos se encuentra, por ejemplo SAHA, el cual fue aprobado por la FDA para el tratamiento de linfoma de células T en el 2006.⁴⁰

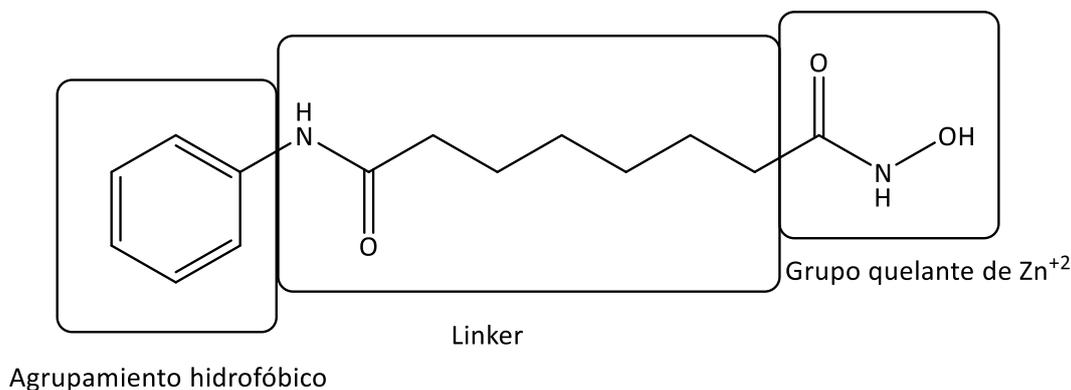


Figura 6. Fármaco SAHA como ejemplo de modelo farmacofórico de iHDACs. Puede observarse un grupo ácido hidroxámico como grupo quelante de Zn²⁺.

La Tricostatina A (TSA) también pertenece al grupo de los ácidos hidroxámicos o hidroxamatos y es un pan-iHDAC, es decir, es capaz de inhibir las 4 clases HDACs.⁴¹ Este compuesto, ha demostrado reducir la viabilidad celular y producir apoptosis en diferentes células resistentes a tumores, además de actuar como sensibilizador a quimioterápicos conocidos.⁴²

A pesar de la gran similitud entre las distintas clases de HDACs, al obtenerse la estructura cristalográfica de varias de ellas, HDAC4 y HDAC7 (clase IIa) mostraron diferencias estructurales significativas con respecto a las HDACs de clase I. La HDAC7, presenta un motivo Zn²⁺ extra de tipo CCHC adyacente al sitio activo de la enzima, que participa en el reconocimiento de la unión al sustrato e interacciones proteína-proteína y que, estabiliza un bolsillo hidrofóbico extra que podría representar un sitio de unión al sustrato. A su vez, a través de métodos teóricos se ha determinado que la presencia de un resto lisina y arginina en el sustrato, es favorable para la interacción con HDAC7.⁴³ HDAC7 es capaz de regular la actividad transcripcional de HIF-1 α bajo condiciones de hipoxia, ya que ambas proteínas forman un complejo con HIF-1 α en el núcleo, potenciando la transcripción de los genes blanco de HIF-1. La unión de HDAC7 a HIF-1 α impide que se una la molécula co-represora a ésta, manteniéndola activa y por otra parte, la unión de HDAC7 a HIF-1 α conduce a un cambio conformacional dentro del dominio inhibitorio del factor de transcripción, facilitando la unión de moléculas coactivadoras e incrementando la actividad transcripcional. Por lo mencionado anteriormente, HDAC7 es considerado un modulador clave para la angiogénesis.⁴⁴

En los últimos años, con el fin de mejorar la eficacia de ambos tratamientos, se han llevado a cabo numerosos estudios para el desarrollo de iHDACs en combinación con otras terapias para el tratamiento de tumores sólidos, actuando éstos como sensibilizadores de células tumorales.³⁵

Antecedentes

Dentro de nuestro grupo, se han desarrollado derivados de *N,N'*-dióxido de fenazinas que combinan dos agrupamientos químicos bioactivos. Por un lado, un sistema bio reducible – la función *N*-óxido- y por otro una estructura plana, con potencial interacción con el ADN, incorporando además, cadenas laterales que estabilicen la interacción con esta biomolécula. Los compuestos fueron evaluados como antitumorales, encontrándose compuestos con la actividad biológica esperada.^{15,16,17,18}

Por otra parte, se han diseñado compuestos como posibles inhibidores de desacetilasas de histonas (iHDACs), y a partir de estudios teóricos, se ha llegado al grado de afinidad de los mismos sobre la enzima mediante cálculos de *docking* teórico realizados previamente en el Laboratorio de Química Teórica y Computacional, mediante el programa AutoDock 4. Se ha utilizado la estructura cristalográfica de HDAC7 extraída del PDB, como modelo de HDAC de clase II. De esta manera se determina la constante de afinidad (K_i) y la posible capacidad quelante de Zn^{2+} de los diferentes compuestos. Algunos de estos pueden observarse en la **figura 8**. En la misma, se muestran cinco derivados diseñados teóricamente que presentaron distintas constantes de afinidad y capacidad quelante de zinc. Para el derivado **a** se ha observado que el ácido hidroxámico y el átomo de oxígeno carbonílico que presenta, coordinaría con el átomo de Zn^{2+} . Además el agrupamiento fenazina se ubicaría en un bolsillo hidrofóbico. Este compuesto presenta constante de afinidad alta, $K_i = 2,06 \mu M$. La K_i del derivado **b** es $18,1 \mu M$, es decir, es un compuesto de baja afinidad. A pesar de poseer un grupo oxima capaz de coordinar con el átomo de Zn^{2+} catalítico, el mismo no presenta grupo *linker* entre el anterior y la fenazina. El derivado **c** de $K_i = 2,43 \mu M$ también presenta la funcionalidad oxima pero además un *linker* entre el mismo y la fenazina, lo que aumentaría las interacciones del anillo con la enzima, contribuyendo a mejorar la capacidad inhibitoria. El derivado **d** no actuaría como quelante de Zn^{2+} de acuerdo a los resultados del *docking*, si bien la $K_i = 1,66 \mu M$. El compuesto **e** ha presentado afinidad media $K_i = 2,33 \mu M$. Se observa que la funcionalidad guanidino interacciona con el sitio activo de la enzima, pero el compuesto no presenta grupo quelante de Zn^{2+} .

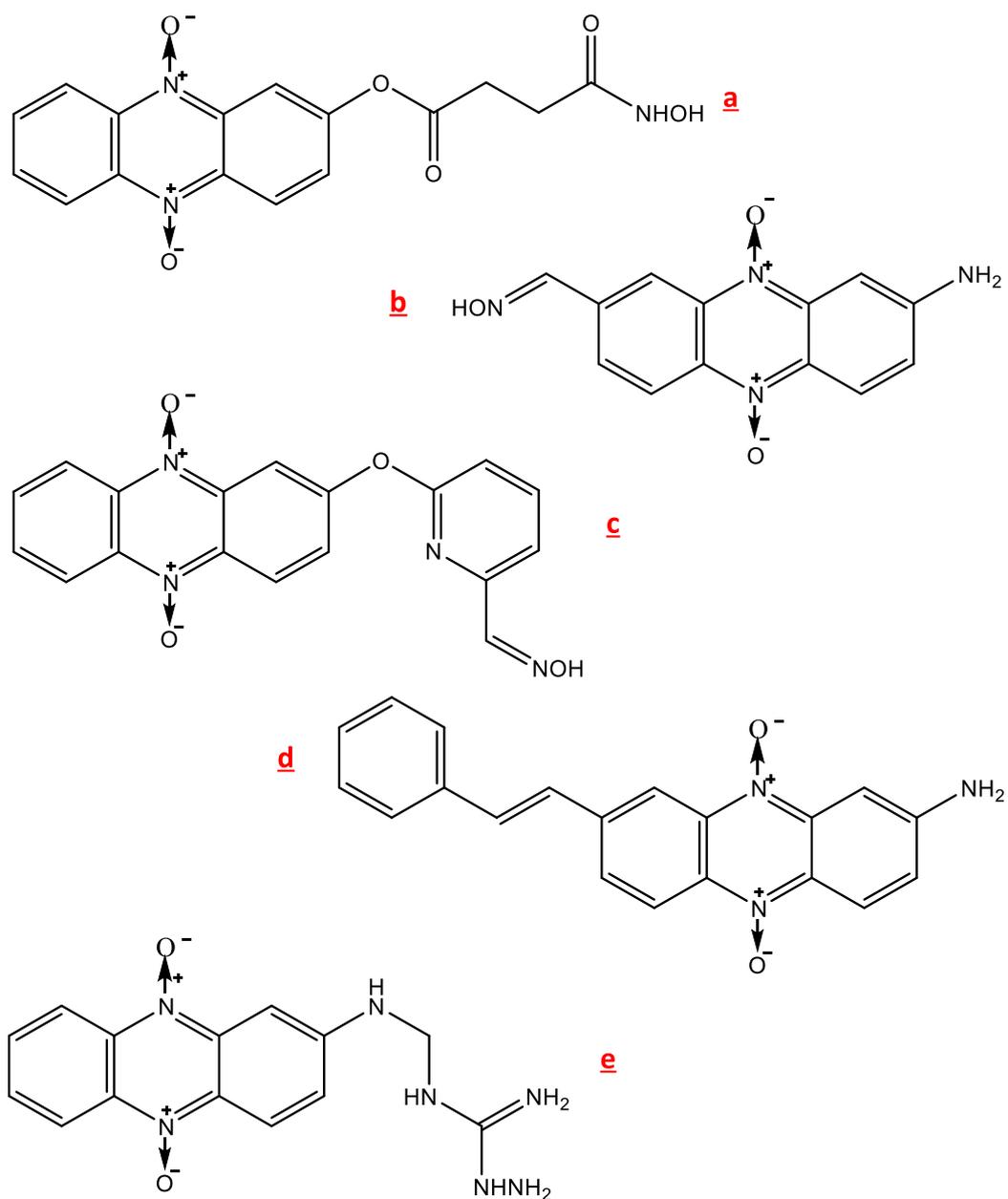


Figura 8. Ejemplos de profármacos diseñados por el grupo de trabajo.

De acuerdo a los antecedentes, nuestro objetivo en el siguiente trabajo es realizar la síntesis de profármacos sensibilizadores inhibidores de HDACs. Con este fin, serán diseñados y sintetizados nuevos derivados de *N,N'*-dióxido de fenazinas como agrupamientos hidrofóbicos, conteniendo un grupo potencialmente quelante de zinc, según el modelo farmacofórico anteriormente descrito (**Figura 9**).

En primera instancia se va a trabajar en condiciones de normoxia.

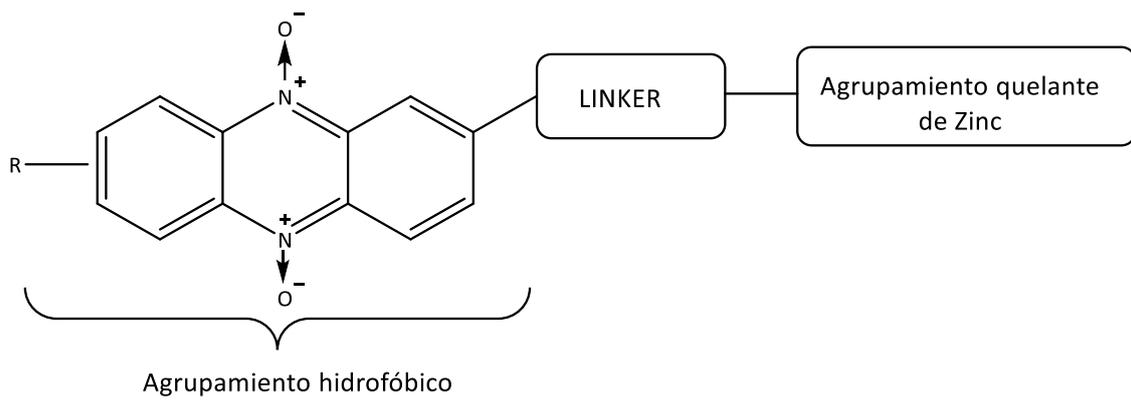


Figura 9. Modelo farmacofórico de iHDACs con derivados de dióxido de fenazinas como agrupamiento hidrofóbico.

Objetivos

- I. Realizar la síntesis orgánica y elucidación estructural de compuestos derivados de *N,N'*-dióxido de fenazina, utilizando el modelo farmacofórico de iHDACs.
- II. Determinar la citotoxicidad de los compuestos en una línea celular normal y la actividad antiproliferativa en una línea celular tumoral.
- III. Determinar los niveles de histona acetilada en la línea celular tumoral.
- IV. Evaluar los compuestos como sensibilizadores al quimioterápico cisplatino.

Materiales y métodos

Síntesis

Los disolventes utilizados se destilan previamente por métodos convencionales. Se emplean reactivos comerciales de las marcas: Sigma-Aldrich, Janssen, Merck, Fluka. El grado de avance de las reacciones se sigue por cromatografía en capa fina (TLC), utilizando placas de sílica gel (Alugram® Sil G/UV254) o alúmina (Alugram® Sil G/UV254) con indicador fluorescente sobre placas de poliéster como fase estacionaria. Diferentes proporciones de CH₂Cl₂: MeOH y AE: EP se emplearon como fase móvil. Las placas cromatográficas se revelaron a través de la exposición a luz ultravioleta y, en algunos casos, se utiliza el reactivo de Brady: asperjado con una disolución de 2,4-dinitrofenilhidrazina/H₂SO₄(c)/EtOH (75%) 1:5:30 (m/v/v).

Las purificaciones se hacen por métodos de extracción, filtración y cromatografía en columna, para las mismas se utiliza como fase estacionaria alúmina (Merck, 70-230 mesh).

Los espectros de ¹H-RMN y ¹³C-RMN se realizan en un equipo BRUKER DPX-400 (400 MHz), empleando dimetilsulfóxido deuterado (DMSO) como disolvente y tetrametilsilano (TMS) como referencia interna. El desplazamiento químico se expresa en ppm y las multiplicidades se designan según: singulete **s**, doblete **d**, triplete **t**, cuarteto **c**, multiplete **m**. La constante de acoplamiento (J) se expresa en hercios (Hz).

Síntesis de derivados de benzofuroxano

En un balón de una boca, se colocan 1,44 gr de NaOH, se agregan 20 mL de MeOH y se calienta a 50°C en baño de aceite hasta la disolución completa del NaOH. Posteriormente, a temperatura ambiente, se agregan 4 gr de anilina y 30 mL de hipoclorito de sodio gota a gota, hasta visualizar la desaparición del color rojo característico de la anilina. Se deja reaccionar durante 15 minutos, en agitación. Se obtiene un sólido que se filtra y seca.

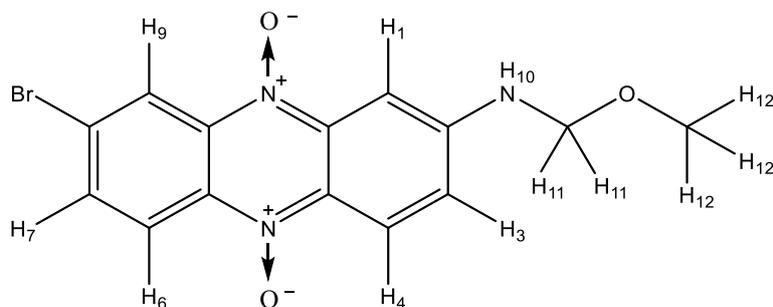
Síntesis de los derivados 1-4 de *N,N'*-dióxido de 2-aminometilmetoxifenazina

En un balón de dos bocas se colocan 100 mg de *N,N'*-dióxido de 2-aminofenazina, 10 mL de MeOH y se comienza a agitar; inmediatamente se agregan 50 µL de formaldehído (CH₂O) y 2 µL de ácido acético glacial (C₂H₄O₂). Se coloca un sistema refrigerante ya que la reacción se lleva a 85°C por 3 horas.

El avance de reacción se evalúa mediante cromatografía en capa fina, siendo la fase estacionaria alúmina y la fase móvil una mezcla de CH₂Cl₂:MeOH (95:5). Luego de transcurridas tres horas, se mantiene agitando a temperatura ambiente durante 2 días, protegiendo al balón de la luz con papel de aluminio. Posteriormente, se deja 24 horas a -20 °C y se filtra. El producto se purifica mediante cromatografía en columna utilizando

alúmina como fase estacionaria y como fase móvil gradiente de mezclas de $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$, comenzando por una mezcla menos polar que para la TLC $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$ (99,5:0,5).

Compuesto 1: *N,N'*-dióxido de 8-bromo-2-aminometilmetoxifenazina.



Rendimiento: 10,4 %

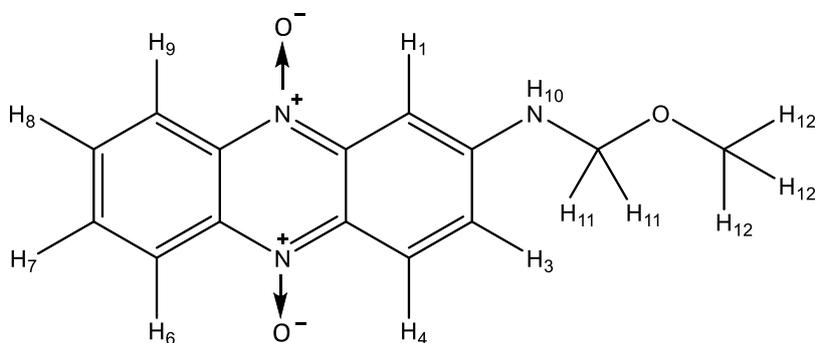
Aspecto: sólido negro

Fórmula: $\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{BrN}_3\text{O}_3$

^1H (DMSO, 400 MHz) δ_{H} (ppm): 3,763 (2H, d, J 21 Hz, H₁₁), 4,88 (s, H₁₀), 7,38 (1H, d, J 8 Hz, H₃), 7,37 (s, H₁), 8,40 (t, J 5,14 Hz, H₉), 8,5(s,H₄), 8,62 (d, J= 2,94 Hz, H₆), 8,33(m,H₇). Se considera sólo las señales correspondientes al isómero mayoritario, es decir, al que posee el grupo Br en la posición 8.

^{13}C -NMR δ_{C} (ppm) (a partir de experimentos de HSQC y HMBC): 42(C-H₁₀), 55(C-H₁₂), 131 (C-H₃), 94 (C-H₁), 121,05(C-H₄), 122(C-H₇), 131,05(C-H₇) 119,05(C-H₉), 124(C- H₆).

Compuesto 2: *N,N'*-dióxido de 2-aminometilmetoxifenazina.



Rendimiento: 14,5 %

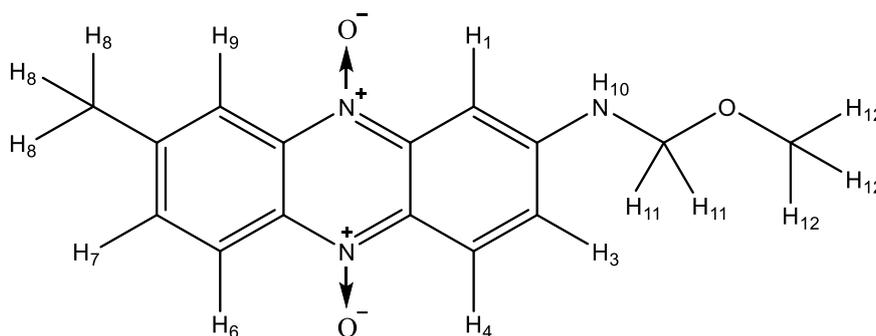
Aspecto: sólido violáceo

Fórmula: $C_{14}H_{13}N_3O_3$

1H (DMSO, 400 MHz) δ_H (ppm): 3,262 (s, H_{12}), 4,72 (2H, d, J 6,34, H_{11}), 5,76 (s, H_{10}), 7,48 (1H, m, J_{3-4} 9,55 Hz, J_{1-3} 2,30 Hz, H_3), 7,51 (s, H_1), 7,83 (2H, m, J 7,8 Hz, J 17 Hz, H_7+H_8), 8,39 (1H, d, J_{4-3} 10 Hz, H_4), 8,46 (2H, t, J 7,98, H_9+H_6).

^{13}C -NMR δ_C (ppm) (a partir de experimentos de HSQC y HMBC): 54($C-H_{12}$), 76($C-H_{11}$), 124 ($C-H_3$), 94 ($C-H_1$), 121,05($C-H_4$), 130 ($C-H_7$), 131,05($C-H_8$), 119,05($C-H_9$), 121($C-H_6$).

Compuesto 3: *N,N'*-dióxido de 8-metil-2-aminometilmetoxifenazina.



Rendimiento: 8,7 %

Aspecto: sólido violáceo

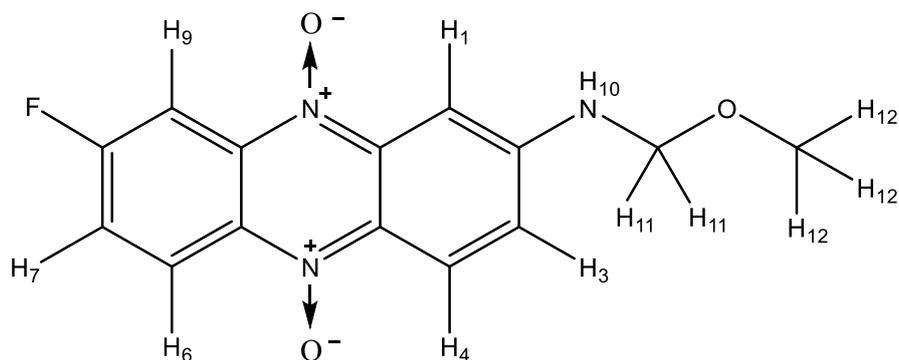
Fórmula: $C_{15}H_{15}N_3O_3$

1H (DMSO, 400 MHz) δ_H (ppm): 3,51 (2H, d, J 7,34 Hz, H_{11}), 4,762 (1H, d, J 6,34 Hz, H_{10}), 7,49 (s, H_1), 7,467 (1H, m, J_{1-3} 2,41 Hz, J_{3-4} 6,7 Hz, H_3), 7,98 (2H, m, J 2,06 Hz, J 9,35 Hz, H_7+H_8), 8,40 (2H, t, J 7,20 Hz, H_9+H_6), 8,65 (1H, d, J 2,02, H_4).

^{13}C -NMR δ_C (ppm) (a partir de experimentos de HSQC y HMBC): 53($C-H_{12}$), 75($C-H_{11}$), 124,05 ($C-H_3$), 94 ($C-H_1$), 121,05($C-H_4$), 133 ($C-H_7$), 134($C-H_8$), 119,05($C-H_9$), 121($C-H_6$).

Se considera sólo las señales correspondientes al isómero mayoritario, es decir, al que posee el grupo $CH_{(8)3}$ en la posición 8.

Compuesto 4: *N,N'*-dióxido de 8-fluor-2-aminometilmetoxifenazina.



Rendimiento: 10,5 %

Aspecto: sólido violáceo

Fórmula: C₁₄H₁₂FN₃O₃

¹H (DMSO, 400 MHz) δ_H (ppm): 3,26 (s, H₁₂), 4,73 (2H, d, J 10,52 Hz, H₁₁), 5,78 (s, H₁₀), 7,487 (1H, d, J1-3 1,90 Hz, H₃), 7,51 (s, H₁), 8,23 (1H₇), 8,38 (1H, d, J4-3 9,88 Hz, H₄), 8,57 (2H, t, J 8,02, H₉+H₆).

Se considera sólo las señales correspondientes al isómero mayoritario, es decir, al que posee el grupo F en la posición 8.

Síntesis del derivado 5 de *N,N'*-dióxido de 2-aminometiletoxfenazina.

En un balón de dos bocas se colocan 100 mg de *N,N'*-dióxido de 2-aminofenazina y 10 mL de EtOH en agitación; inmediatamente se agregan 50 µL de formaldehído (CH₂O) y 2 µL de ácido acético glaciar (C₂H₄O₂). Se coloca un sistema refrigerante ya que la reacción se lleva a cabo a 85 °C durante tres horas.

El avance de la reacción se evalúa mediante cromatografía en capa fina, siendo la fase estacionaria alúmina y la fase móvil una mezcla de CH₂Cl₂:MeOH (95:5). Luego de transcurridas 3 horas, se mantiene a temperatura ambiente, en agitación por dos días, cubierto de la luz con papel de aluminio. Posteriormente, se deja 24 horas a -20 °C y se filtra. El producto se purifica mediante cromatografía en columna utilizando alúmina como fase estacionaria y como fase móvil gradiente de mezclas de CH₂Cl₂: MeOH, comenzando por una mezcla menos polar que para la TLC CH₂Cl₂: MeOH (99,5:0,5).

Síntesis de los derivados 6-9 de *N, N'*-dióxido de 2-aminoguanidilfenazina

En un balón de dos bocas se colocan 100 mg de *N, N'*-dióxido de 2-aminofenazina, 100 mg de bicarbonato de aminoguanidina (H₂NNH)(=NH)NH₂), 10 mL de CH₂Cl₂ seco (con jeringa), una gota de formaldehído y una gota de ácido acético. Siempre en agitación, atmósfera de nitrógeno y reflujo, la reacción se lleva a cabo a 85°C durante 3 horas.

La se evalúa el avance de reacción mediante cromatografía en capa fina, utilizando alúmina como fase estacionaria y como fase móvil una mezcla CH₂Cl₂:MeOH (95:5) y Acetato de etilo:MeOH (85:15). Para sembrar, se realiza un procesamiento bicarbonato/acetato de etilo. Se deja a -20 °C toda la noche, se filtra y purifica mediante cromatografía en columna, con alúmina como fase estacionaria y mezcla CH₂Cl₂:MeOH como fase móvil.

Ensayos biológicos

Actividad citotóxica y antiproliferativa

Los ensayos se realizan con cultivos celulares en adhesión en fase exponencial de crecimiento de las líneas celulares V79-4 (ATCC® CCL-93™) (derivadas de fibroblasto de pulmón de Hamster Chino) y U-2 OS (ATCC® HTB-96™) (derivadas de osteosarcoma humano). Se utilizan medios de cultivo DMEM (Gibco, Invitrogen) y Mc Coy's 5A (Applichem), respectivamente. Los medios se suplementan con SFB (Gibco), glutamina (2mM), 100 U/mL de penicilina y 100 mg/mL de estreptomina. Al cultivo, se le retira el medio de cultivo, se lava con PBS estéril y se agrega tripsina-EDTA e incuba por 5 minutos a 37 °C. Una vez que las células se han despegado, se neutraliza con la misma cantidad de medio de cultivo completo. Se toma una pequeña alícuota, se diluye y se realiza el recuento del número de células totales utilizando la cámara de Neubauer. Se calcula la dilución del cultivo para sembrar una placa de 96 pocillos con 10.000 células/pocillo en un volumen final de 100µL, es decir 100.000 células/mL. El volumen inicial es calculado mediante: $C_i \cdot V_i = C_f \cdot V_f$, y se completa con medio de cultivo fresco. Se siembra la placa y se incuba durante 24 horas a 37°C en atmósfera humificada y 5% de CO₂. Al día siguiente, se retira el medio de cultivo y se agregan las soluciones de los compuestos disueltos en medio de cultivo fresco. Las mismas, se preparan a partir de soluciones stock de 16, 8, 4, 2 y 1 mM en DMSO. Para esto, se toman 2 µL de cada una de las soluciones y se completa con 398 µL de medio de cultivo para alcanzar las concentraciones 80, 40, 20, 10 y 5 µM respectivamente, la concentración de DMSO no excede el 0,5 %. Asimismo, se prepara una solución de cisplatino a 20 µM a partir de una solución madre de 1 mg/mL en suero fisiológico estéril. Como controles se utilizaron DMSO al 0,5 % y medio de cultivo con y sin MTT. Se incuba durante 24 horas en estufa a 37°C, 5% CO₂. Posteriormente, se revela agregando 10 µL de solución de MTT 5 mg/mL – en PBS-, se incuba durante 4 horas a 37°C. Pasadas éstas, se quita la solución de medio de cultivo con MTT, se agrega DMSO, se homogeniza y se realiza la lectura de absorbancia a 570 nm.

Los cálculos se realizaron a través del programa Excel y los gráficos en el GraphPad Prism 6.

Determinación de los niveles de histona acetilada mediante Western blot

Este ensayo se ha realizado utilizando cultivos celulares en suspensión de la línea celular U-2 OS.

Se preparan 16 placas de Petri, con alrededor de 500.000 células/placa. Cuando las mismas se encuentran en una confluencia adecuada, se incuban 24 horas a 37 °C con los cuatro compuestos: 1, 2, 3 y 4, TSA y DMSO como control, cada uno por duplicado. Posteriormente, a cada placa de Petri se le realizan dos lavados con PBS frío, manteniendo las mismas en hielo durante el procedimiento. Luego se realiza el scraping en 650 µL de buffer Laemmli (0,6 mL de Tris pH 6.8, 2,5 mL de glicerol 25%, 2 mL de SDS 2%, 0,5 mL de β-mercaptoetanol 5%, 1 mL de Azul de bromofenol 0,10% y 3,4 mL de H₂O UP), cada muestra se transfiere a un tubo eppendorf, se hierve cada uno a 96°C durante 10 minutos y se guardan a -20 °C hasta el análisis.

Se preparan dos geles poliacrilamida 15 %, inicialmente se coloca con una pipeta pasteur el gel separador: H₂O UP 3,4 mL, acrilamida 30% 7,5 mL, Tris 1.5 M pH = 8.8 3,8 mL, SDS 10% 150 µL, PSA 10% 150 µL y TEMED 6 µL y a continuación el gel concentrador: H₂O UP 4,1 mL, acrilamida 30% 1 mL, Tris 1.5 M pH =6.8 750 µL, SDS 10% 60 µL, PSA 10% 60 µL y TEMED 6 µL.

Se monta el dispositivo y se cargan las muestras en los pocillos del gel. La electroforesis se realiza a voltaje fijo: 110 V y amperaje libre durante por lo menos 2 horas, hasta que se visualiza la desaparición del frente de corrida. Se utiliza buffer de corrida, el cual se prepara agregando 100 mL de Tris-Glicina 10x, 10 mL de SDS 10% y 890 mL de H₂O destilada.

Transferencia: La transferencia de proteínas desde el gel a una membrana PVDF (fluoruro de polivinilideno) previamente hidratada en metanol absoluto, se realiza a 4°C durante 1 hora y 15 minutos a amperaje fijo de 350 mA, voltaje libre en buffer de transferencia el cual se prepara agregando 100 mL de Tris-glicina 10x, 10 mL de SDS 10%, 200 mL etanol 96% y 690 mL de H₂O destilada.

Incubación: La membrana se lava con PBS-Tween 20 0,1 %, se bloquea la membrana con buffer de bloqueo (PBS-Tween + 5% leche descremada en polvo) 1 hora en agitación. Se realizan dos lavados de 10 minutos con PBS-Tween y se incuba con anticuerpo primario toda la noche, en agitación a 4°C. Se utilizó el anticuerpo anti-Histona H4 acetilada de conejo (H4k8Ac, ab45166 Abcam) diluido 2/6000. Se realizan dos lavados de 10 minutos con PBS-Tween en agitación y se incuba 1 hora en oscuridad con anticuerpo secundario IgG anti-conejo conjugado con la enzima HRP, la dilución es 1/2000. Se realizan dos lavados con PBS-Tween durante 10 minutos y se procede al revelado.

Revelado: Se mezclan partes iguales de los sustratos A y B del kit de quimioluminiscencia HRP Novex ECL Invitrogen, 1.5 mL por membrana, se los coloca sobre la membrana, se seca con papel absorbente, se coloca el papel fotográfico sobre la misma durante diferentes períodos de tiempo y luego se revela utilizando revelador. Luego de percibir la aparición de bandas, el film fotográfico se enjuaga en agua y se fija en solución de fijación y, por último se lava con abundante agua.

Stripping: Se coloca la membrana nuevamente en PBS-Tween. Se realizan dos incubaciones de 30 minutos con Glicina 0.2 M pH 2.8 (3 g de glicina en 200 mL de H₂O destilada), se lava 3 veces con PBS-Tween durante 10 minutos, se bloquea con buffer de

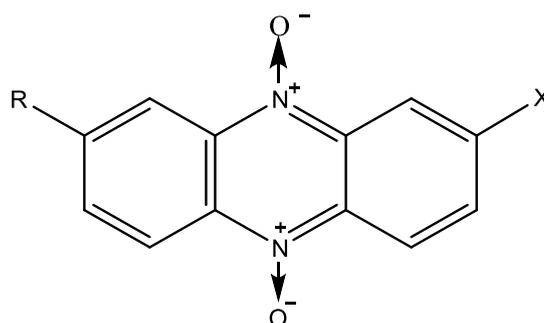
bloqueo durante una hora a temperatura ambiente y agitando. Nuevamente, se lava con PBS-Tween 2 veces durante 10 minutos y por último se incuba con anticuerpo primario anti-Histona H4 (dilución 1/500) toda la noche a 4°C y agitación. El anticuerpo es anti-Histona H4 total, dilución 2/1000.

Al día siguiente se incuba durante una hora con el mismo anticuerpo secundario y el revelado se realiza de igual manera que para el caso anterior.

La densitometría se realiza mediante el programa Image J, el tratamiento de datos en Excel y los gráficos en el GraphPad Prism 6.

Síntesis química: resultados y discusión

Se ha intentado desarrollar una serie de compuestos derivados de *N,N'*-dióxido de fenazina como posibles inhibidores de desacetilasas de histonas, con el fin de que actúen como sensibilizadores en terapias antitumorales. Los mismos se muestran en la **figura 10**.



Compuesto	R	X
1	Br	
2	H	
3	CH ₃	
4	F	
5	Br	
6	Br	
7	H	
8	CH ₃	
9	F	

Figura 10. Derivados de de *N,N'*-dióxido de fenazina. Se observa distintos colores según diferencias en X.

Se parte en algunos casos del *N,N'*-dióxido de 2-aminofenazina, y en otros, los mismos se sintetizan a partir del benzofuroxano correspondiente.

La síntesis química de los *N,N'*-dióxido de fenazinas, se realiza a través de la reacción de Beirut, de cuatro pasos. Consiste en la expansión de distintos derivados de benzofuroxanos (*N*-óxido de benzo[1,2-*c*]1,2,5-oxadiazol) con diferentes derivados de fenol en medio básico. Los rendimientos de la reacción son buenos.⁴⁴

El mecanismo de reacción puede observarse en la **Figura 11**. El metóxido presente desprotona al fenol, generándose un fenolato, quedando la carga negativa sobre el carbono orto al fenol. El mismo, ataca al nitrógeno más electrofílico, lo que produce una redistribución de cargas que vuelve al nitrógeno restante nucleofílico, atacando éste al carbono carbonílico, formándose un ciclo. Por último se completa la aromatización del anillo y se pierde una molécula de agua, formándose la fenazina correspondiente.⁴⁵

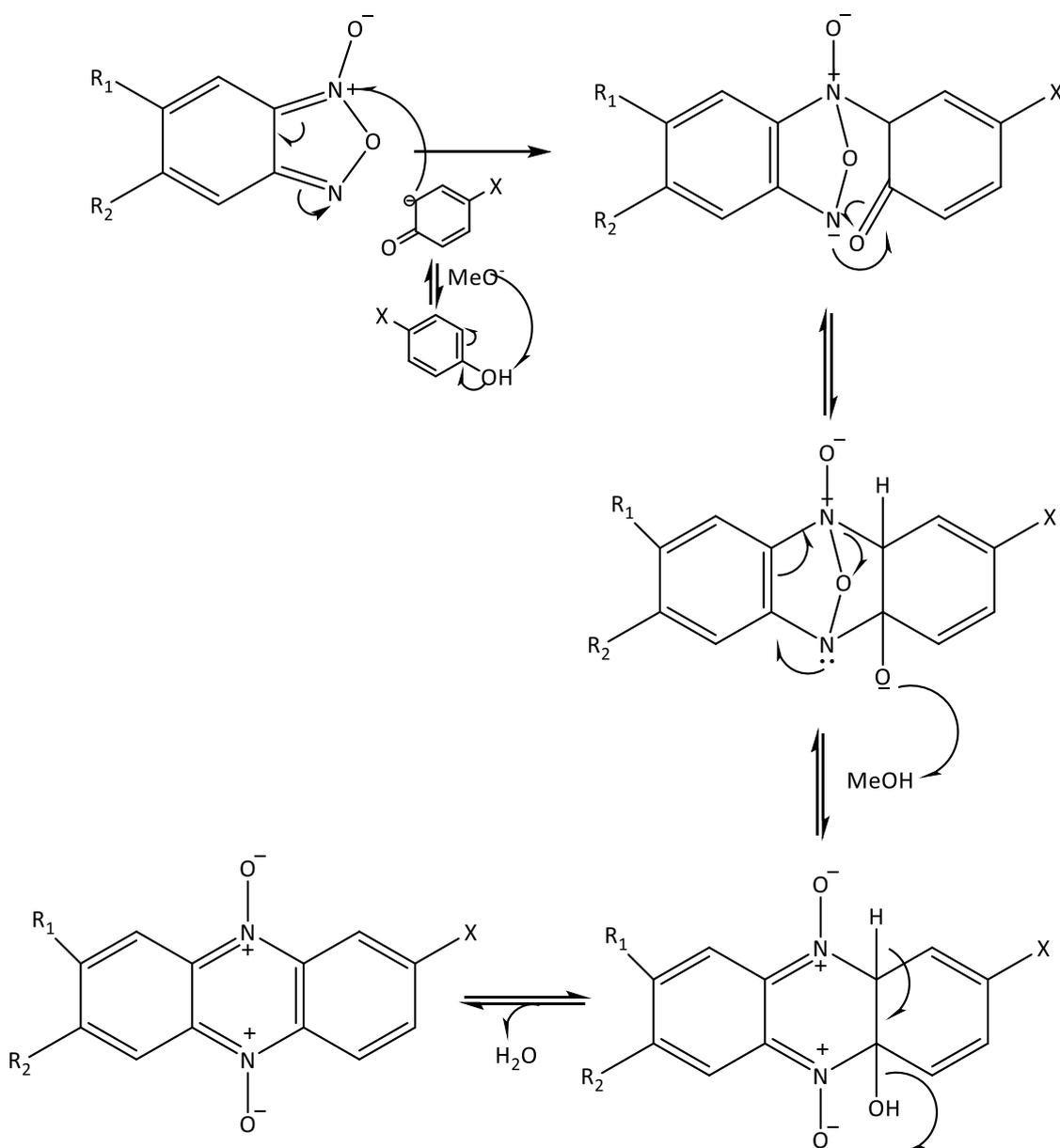
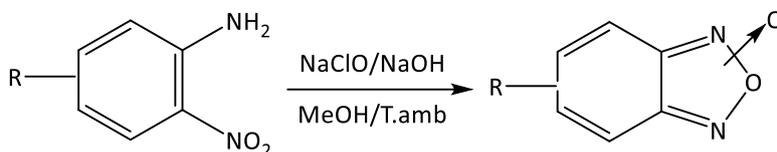


Figura 11. Mecanismo para la síntesis de *N,N'*-dióxido de fenazinas.

Síntesis de benzofuroxanos.

Se parte de nitroanilinas comerciales, las mismas se oxidan con hipoclorito de sodio para producir el benzofuroxano correspondiente (**Figura 12**).



R = F rendimiento: 81,5 %

R = H rendimiento: 93 %

Figura 12. Síntesis de benzofuroxano a partir de nitroanilina. Puede observarse el rendimiento de las reacciones.

El avance de reacción se analiza mediante cromatografía en capa fina (CCF), se utilizan como patrones de seguimiento el reactivo, es decir, nitroanilina y el producto, sintetizado previamente por el grupo de trabajo. Para sembrar en la CCF se debe realizar un mini work-up. Al estar en presencia de una amina, se necesita que el medio acuoso sea básico, ya que si fuese ácido la misma se protonaría y pasaría a la fase acuosa, por lo que se realiza en agua saturada en bicarbonato de sodio como fase acuosa y acetato de etilo como fase orgánica. La reacción es completa, por lo que no es necesario ningún paso de purificación.

Síntesis de los derivados 1-4 de *N,N'*-dióxido de 2-aminometilmetoxifenazina

Como se ha mencionado anteriormente, se parte de *N,N'*-dióxido de 2-aminofenazina como reactivo, sintetizados previamente por el grupo de trabajo. El producto de la síntesis se observa en la **figura 13**. El avance de la reacción se evalúa a través CCF, donde se utiliza como patrón la *N,N'*-dióxido de 2-aminofenazina de partida. Se siembra el crudo de reacción.

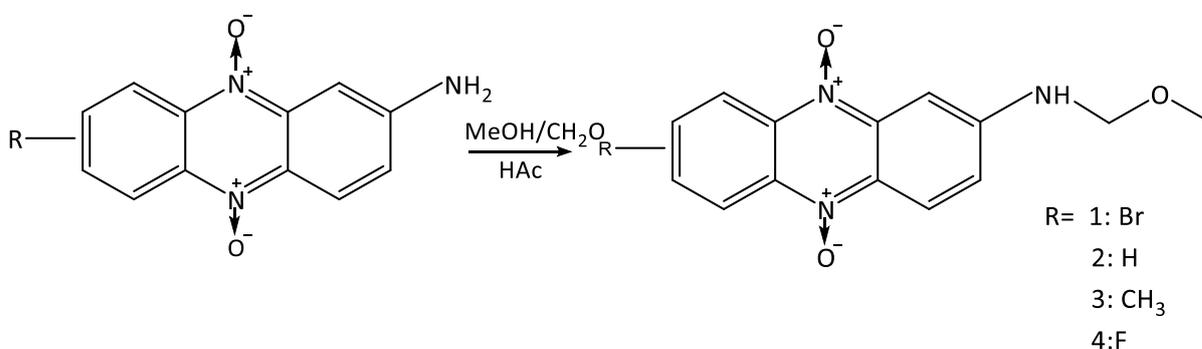


figura 13. Síntesis de los derivados 1-4 de *N,N'*-dióxido de 2-aminofenazina.

Los compuestos han sido sintetizados en un único paso mediante sustitución nucleofílica de la *N,N'*-dióxido de 2-aminofenazina a formaldehído y posterior adición de metanol al intermedio imina. El mecanismo de reacción se muestra en la **figura 14**.

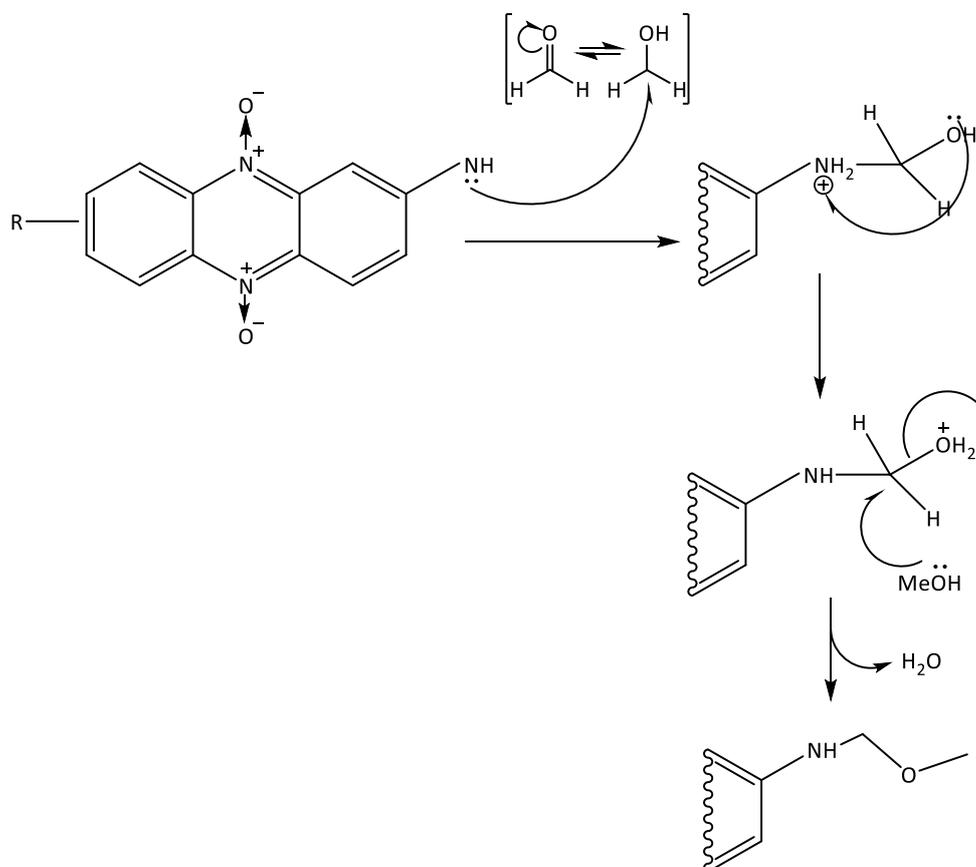


Figura 14. Mecanismo de reacción.

Los compuestos obtenidos, junto con sus rendimientos se muestran en la **tabla 1**. Se utilizan las mismas condiciones en todos los casos.

Tabla 1. Rendimiento de los diferentes compuestos sintetizados

Compuesto	R	Rendimiento (%)
1	Br	10,4
2	H	14,5
3	CH ₃	8,7
4	F	10,5

Los rendimientos resultan bajos debido a que el grupo NH₂ es mal nucleófilo, lo cual se debe a su carácter electrón-dador por efecto resonante (+M); sus electrones se encuentran resonando en los anillos aromáticos, encontrándose menos disponibles para reaccionar. Debido a esto, la reacción nunca es completa, quedando siempre un remanente de reactivo el cual se separa del producto deseado mediante la técnica de cromatografía en columna.

En principio los rendimientos obtenidos eran menores aún, debido al proceso de purificación del producto previo a la filtración. En primer lugar se intenta aislar mediante la técnica de extracción, utilizando como fase orgánica acetato de etilo y como fase acuosa solución de bicarbonato de sodio. Como el producto resulta ser soluble en ambas, se observa la formación de emulsiones y el rendimiento obtenido fue menor al presentado. Luego se intenta precipitar con H₂O, lo cual nuevamente, llevaba a pérdidas de producto. Finalmente se optó por dejar el balón toda la noche en el - 20 °C y filtrar, de esa manera se obtuvo el rendimiento presentado en la **tabla 1**.

Análisis espectroscópico

Los productos obtenidos fueron caracterizados mediante ¹H-RMN, ¹³C-RMN y espectros bidimensionales de COSY, HSQC y HMBC.

Se describe la caracterización del compuesto **2** a modo de ejemplo. En el espectro de ¹H-RMN pueden distinguirse dos regiones principales, una correspondiente a los protones del heterociclo de fenazina y otra, a los de la cadena lateral alquímica.

En la **figura 15** se observa el espectro de ¹H-RMN de la zona correspondiente a los protones del heterociclo de fenazina. En la misma, se observa la asignación de cada uno de los protones basándonos en la integración de los picos, y los espectros bidimensionales anteriormente mencionados.

La señal de H₃ es claramente identificable ya que corresponde a una señal del tipo doblete de doblete, como consecuencia de la influencia de H₄ en posición orto y H₁ en meta. La misma presenta una constante de acoplamiento J = 2,31 Hz que se corresponde al acoplamiento con H₁ y J= 9,55 Hz, correspondiente al acoplamiento con H₄. La misma presenta un desplazamiento químico igual a 7,49 ppm. La señal del protón H₁ puede distinguirse de la de H₄ debido a que la presencia del átomo de nitrógeno de la amina produce un efecto electrón dador, por ende H₁ se encontraría menos desprotegido que H₄, resultando en un desplazamiento químico menor. H₄, al encontrarse cerca del grupo N-óxido, se encuentra desprotegido y su desplazamiento químico se observa a campo más bajo, es decir, desplazamiento químico mayor.

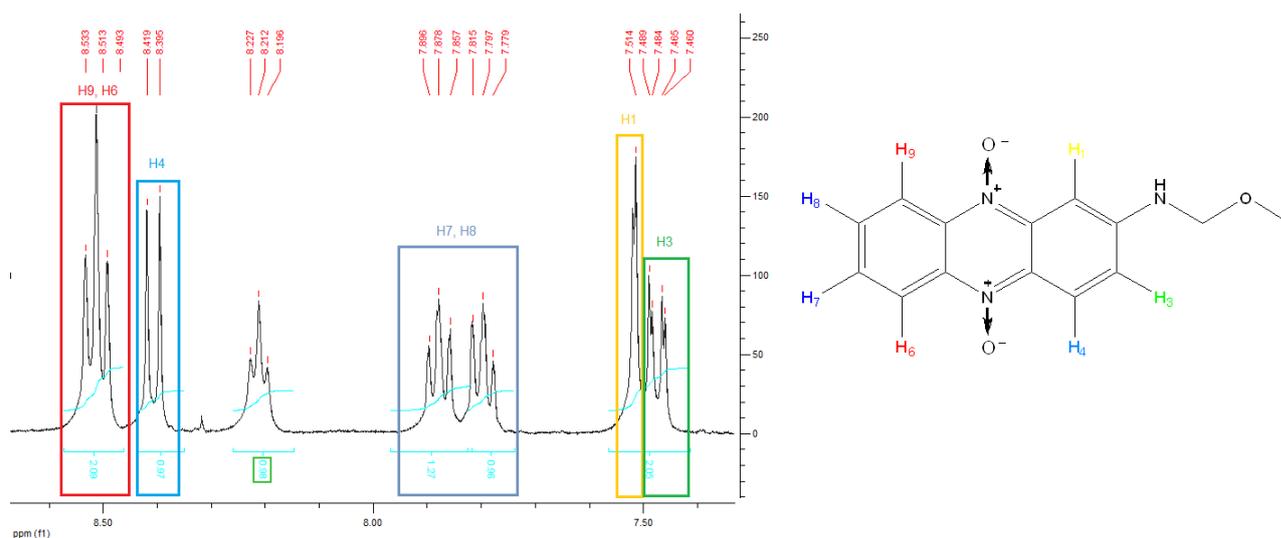


Figura 15. Región entre 7.0 y 9.0 ppm del espectro de ^1H -RMN del compuesto **2**. El mismo, se procesa mediante el uso del software MestReNova.

La señal de H_4 se observa como un doblete, con desplazamiento químico de 8,392 ppm, una constante de acoplamiento de 10 Hz y un área de integración igual a uno. En el espectro bidimensional de correlación homonuclear COSY (**figura 16**) puede observarse la correlación entre H_3 y H_4 en rojo.

La señal de los protones H_9 y H_6 puede observarse a desplazamientos químicos mayores, lo cual es lógico si tenemos en cuenta que se encuentran adyacentes a los grupos *N*-óxido, por lo que se encuentran desapantallados. La integración de la señal da aproximadamente 2. En el espectro COSY se muestra la correlación con los protones H_7 y H_8 . Los mismos tienen una señal del tipo multiplete con un desplazamiento químico 7,84 ppm y un área de integración igual a 2.

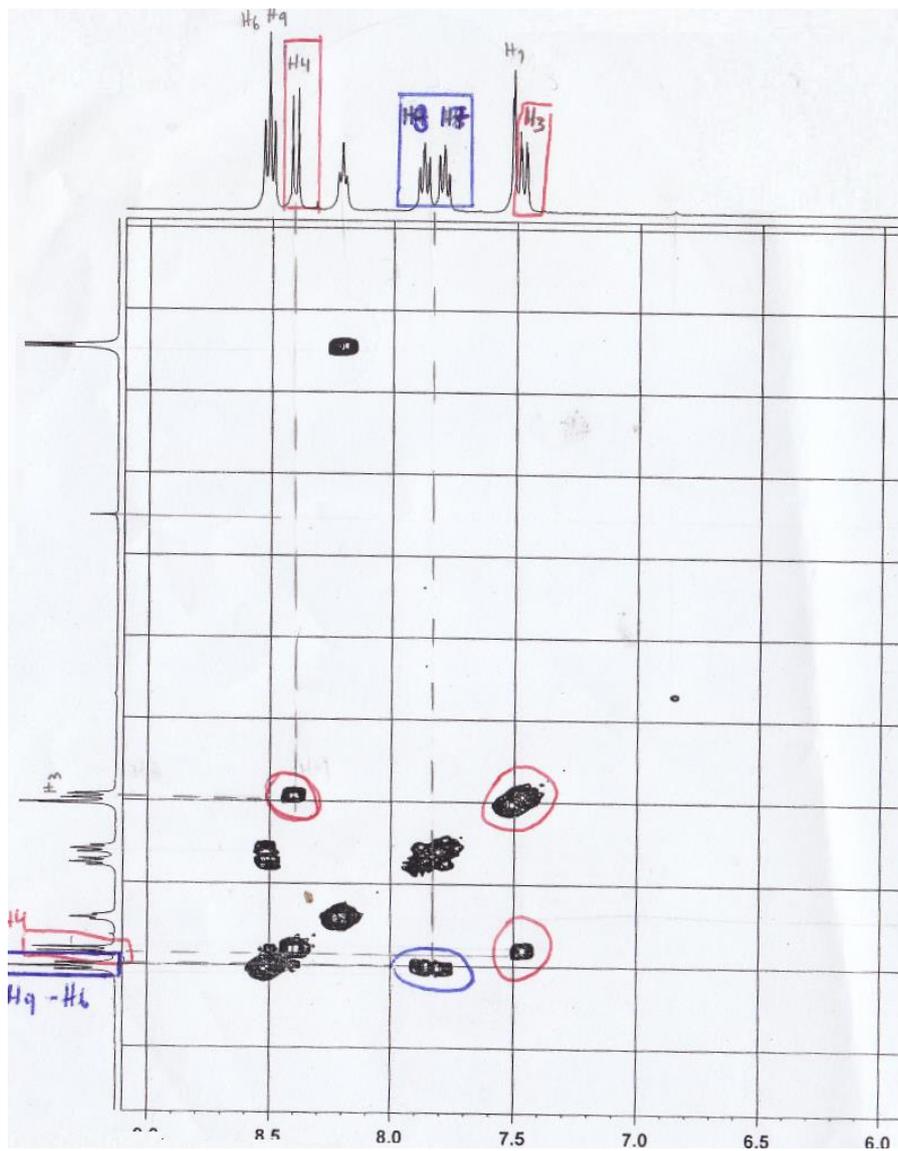


Figura 16. Espectro cosy de la zona correspondiente al heterociclo de fenazina del derivado **2**.

En la **figura 17** se puede observar la señal que se designó para cada grupo de protones de la cadena alílica.

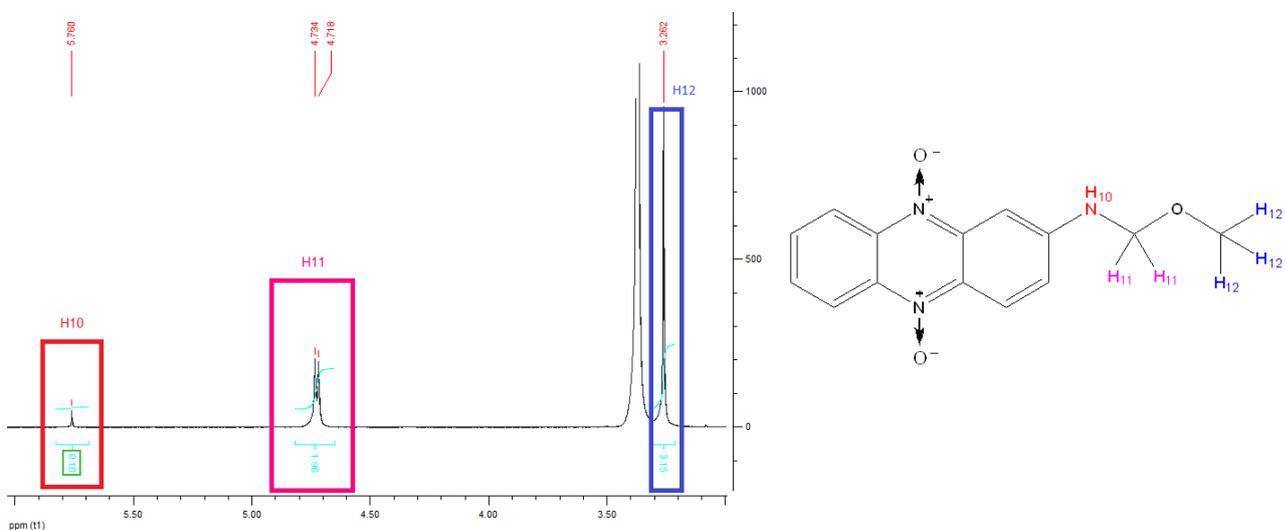


Figura 17. Se observa el espectro de ¹H-RMN, donde se encuentran las señales correspondientes a la cadena alílica, correspondiente a la región de entre 3 y 6 ppm.

La señal del metilo H₁₂ puede observarse como un singulete, con integración igual a tres, que presenta un desplazamiento igual a 3,26 ppm. La señal de H₁₁ se observa como un doblete a 4,55 ppm, con una constante de acoplamiento $J = 6,34$ Hz. Se encuentra desdoblada por la presencia del del protón H₁₀ de la amina. La misma integra dos. La señal de H₁₀ se encuentra a 5,76 ppm e integra aproximadamente 1, se encuentra a campo más bajo que el resto porque pertenece a una amina y el átomo de nitrógeno es electronegativo, por lo que H₁₀ se haya desprotegido.

En la **figura 18** puede observarse el espectro de correlación heteronuclear HSQC. En el mismo, se muestra la correlación bidimensional de cada protón con su carbono correspondiente, el experimento muestra la correlación H-C a un enlace de distancia. El círculo amarillo corresponde al carbono a un enlace del protón H₃, el rojo al H₁, el verde al H₄, el naranja a los protones H₁₁ y el azul al correspondiente a los protones H₁₂. El H₁₀ no se correlaciona con ningún carbono, lo cual confirmaría que el mismo corresponde al grupo amina.

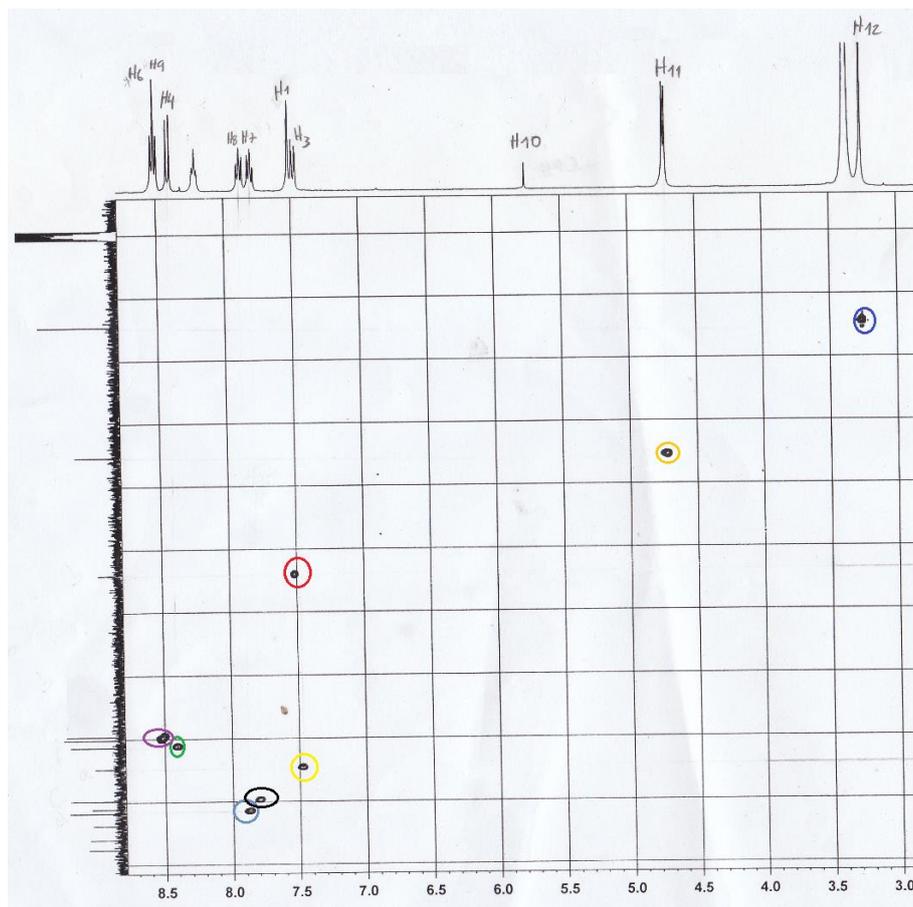


Figura 18. Espectro HSQC del compuesto **2**.

Para identificar qué carbono corresponde a H₆ y H₉ y, H₈ y H₇ se debe tener en cuenta la deslocalización parcial de carga que presenta la molécula. Como puede observarse en la **figura 19**, los carbonos correspondientes a H₇ y H₉ se encuentran cargados positivamente, por lo que el desplazamiento químico de los carbonos correlacionados con los mismos deberá ser menor. Así, puede concluirse que el carbono correlacionado con H₆ presenta un desplazamiento químico de 121 ppm, mientras que el asociado a H₉ es de 119,05 ppm. Los mismos aparecen bastante superpuestos y se muestran en el círculo violeta. De la misma manera, el desplazamiento químico del carbono correlacionado con H₈ es de 131,05 ppm (círculo celeste), mientras que el de H₇ es de 130 ppm y se representa con un círculo negro.

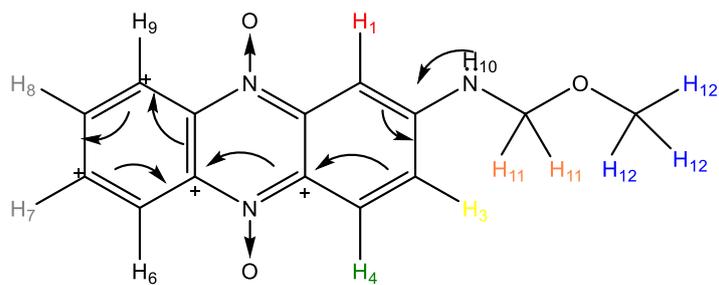


Figura 19. Deslocalización parcial de cargas del compuesto **2**.

Para verificar los carbonos cuaternarios del heterociclo se utiliza el método HMBC, el cual establece correlaciones entre carbonos y protones vecinos a más de un enlace. En la **figura 20** se representa el espectro de HMBC del compuesto **2**. Para la asignación de los carbonos cuaternario también es necesario observar la deslocalización de cargas. Así, en color rojo se representa la correlación entre el carbono cuaternario del anillo aromático H_4C-C-N a 131,05 ppm y H_4 y H_1 y H_3 , y en azul las correspondientes a la correlación entre los protones H_1 y H_4 con H_1C-C-N (138 ppm). En verde se representa la correlación entre los protones H_6 , H_7 , H_8 y H_9 con los carbonos cuaternarios H_9C-C-N (136 ppm) y $N-C-CH_6$ (134 ppm).

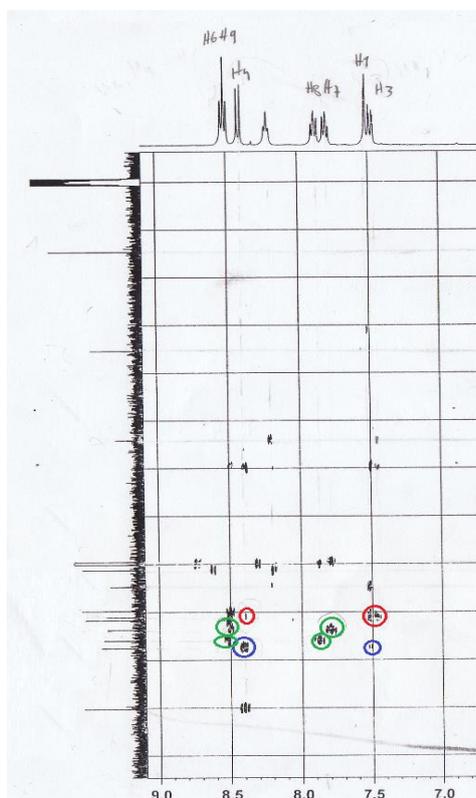


Figura 20. Espectro HBQC para el ompuesto **2**.

Síntesis del derivado 5 de *N,N'*-dióxido de 2-aminometiletoxifenazina
 La síntesis y procesamiento de este derivado ocurre de la misma manera que para los derivados **1-4** de *N,N'*-dióxido de 2-aminofenazina, salvo que se utiliza EtOH en vez de metanol, lo cual hace variar el largo de ramificación de la cadena lateral. La molécula se muestra en la **figura 21**.

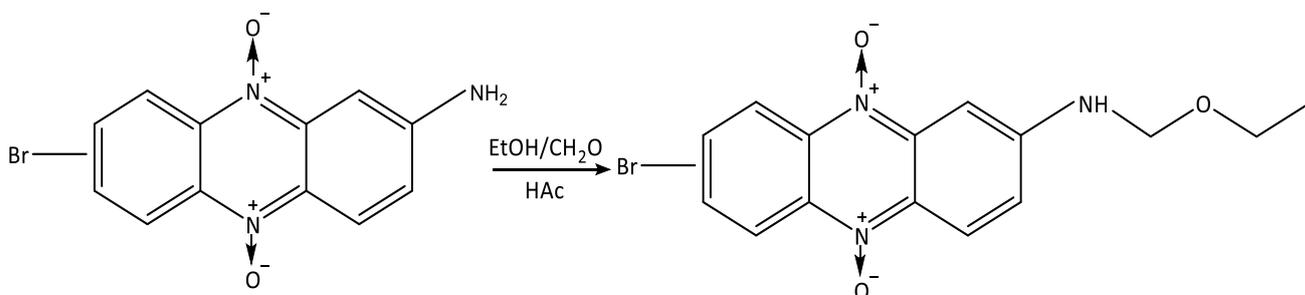


Figura 21. Síntesis de derivado de *N,N'*-dióxido de 2-aminofenazina, donde se puede observar la presencia de un metilo extra respecto a los derivados de la primer serie de compuestos.

Lamentablemente, se tuvo problemas a la hora de realizar la purificación, por lo que no pudo realizarse la elucidación estructural del mismo, por no obtenerse en cantidad suficiente.

Síntesis de los derivados 6-9 de *N,N'*-dióxido de 2-aminoguanidilfenazina

Por otra parte, se intenta sintetizar otros compuestos derivados de *N,N'*-dióxido de 2-aminofenazina a partir de diferentes grupos R, como puede observarse en la **figura 22**.

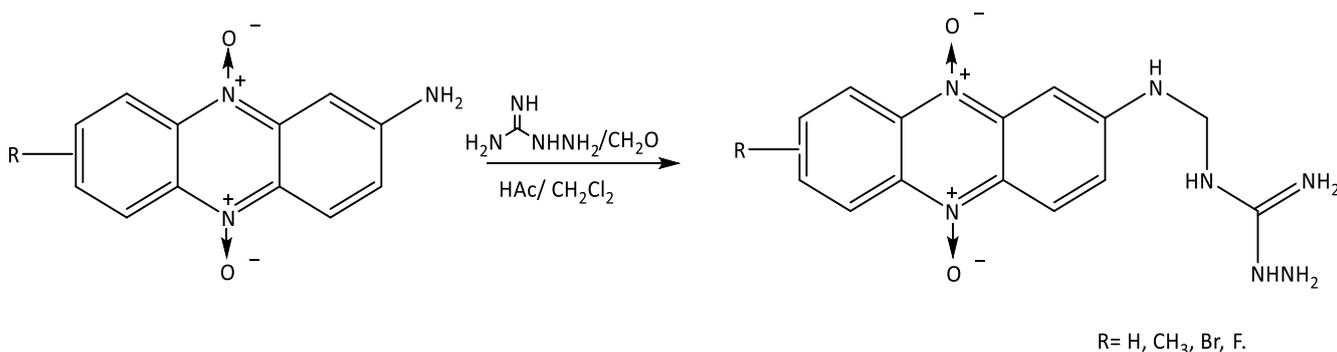


Figura 22. Esquema de síntesis de derivado de *N,N'*-dióxido de 2-aminofenazina

En este caso, lamentablemente, no se obtuvieron los productos esperados. Al seguir la reacción por CCF pudo observarse una señal que se esperaba fuese el producto pero, en todos los casos, al momento de realizar la purificación por cromatografía en columna la misma desaparecía. Creemos puede deberse a la gran inestabilidad del producto o a que el mismo se descompusiera durante la noche.

Resultados y discusión

Evaluación biológica

A partir de los derivados **1-4** de *N,N'*-dióxido de fenazina sintetizados, mencionados anteriormente, se procedió a la evaluación biológica.

La serie de compuestos que se obtuvo podrían funcionar como inhibidores de HDACs. Como se ha mencionado en la introducción, los ácidos hidroxámicos han probado ser buenos como agrupamiento quelante del átomo de Zn^{+2} , actividad requerida en iHDACs. Nuestros derivados no poseen ese grupo, pero como se ha podido observar, en su cadena lateral poseen una amina secundaria muy cercana a un grupo éter, con potencial capacidad de formación de enlaces de coordinación con el átomo de Zn^{+2} .

Con el fin de comprobarlo, se realizaron estudios de citotoxicidad mediante ensayo MTT en fibroblastos de pulmón de hamster (V79) y la actividad antiproliferativa en la línea celular de osteosarcoma humano (U-2 OS).

Posteriormente, con la finalidad de evaluar la posible inhibición de HDACs se realizaron ensayos de western blot en la línea celular U-2 OS.

Fundamento de la técnica de MTT

El ensayo colorimétrico de MTT se utiliza para evaluar rápidamente la citotoxicidad y la actividad anti-proliferativa de los compuestos químicos sintetizados.⁴⁷ El ensayo se basa en la habilidad de las células viables de metabolizar el bromuro de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol] (MTT) hidrosoluble en cristales de formazán, lo cual sirve como determinante de actividad mitocondrial. Como para la mayoría de las poblaciones celulares la actividad total mitocondrial está relacionada con el número de células viables, este ensayo es utilizado para medir efectos citotóxicos de compuestos químicos en distintas líneas celulares o células primarias de pacientes.^{48,49}

Citotoxicidad en V79

En una placa de 96 pocillos se siembran las células V79-4 (ATCC® CCL-93™), utilizando medio de cultivo DMEM, se incuba durante 24 horas a 37 °C. A continuación, se retira el medio de cultivo, y las células se incuban con los compuestos por 24 horas en concentraciones de 80, 40, 20, 10 y 5 μ M por triplicado, además de los correspondientes controles: medio de cultivo con y sin MTT y DMSO 0,5%. Posteriormente, se evalúa la viabilidad celular midiendo la reducción del MTT a formazán, mediante la acción de reductasas celulares. Para lo siguiente, se agrega una solución de MTT 5 mg/mL en PBS y se incuba durante 4 horas. Por último, se retira el medio y se adiciona DMSO, con el fin de disolver los cristales de formazán. El ensayo se realiza por duplicado.

Se mide la absorbancia a 570 nm en espectrofotómetro, se procesan los datos, se grafica el porcentaje de viabilidad en función de la concentración de compuesto y se determina

la IC₅₀ mediante el programa Graphpad prism, los resultados se muestran en la **figura 23**.

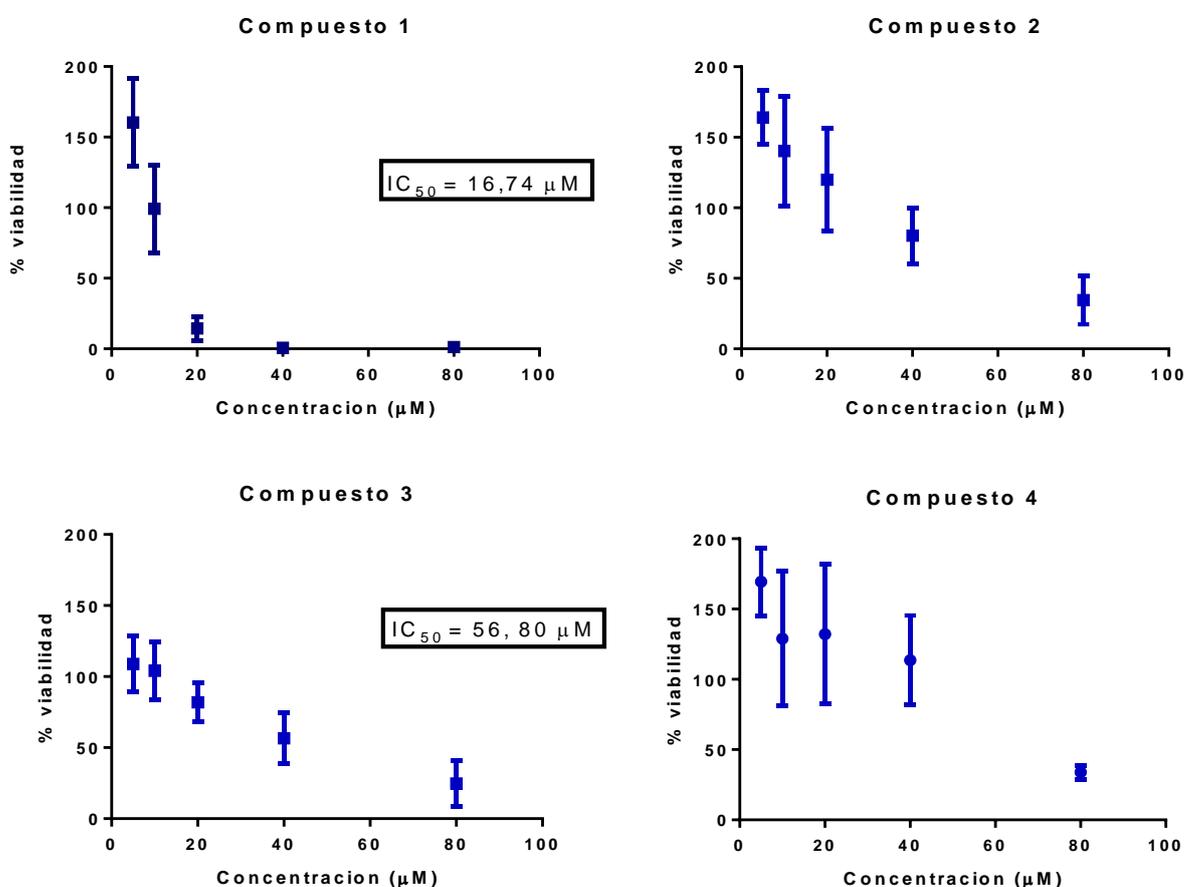


Figura 23. Porcentaje de viabilidad de los compuestos en función de la concentración. El IC₅₀ para los compuestos 2 y 4 es >80 µM.

Actividad antiproliferativa en U-2 OS

Se determina la actividad antiproliferativa de los compuestos a 24 horas. Para esto, en una placa de 96 pocillos se siembran las células U-2 OS (ATCC® HTB-96™), utilizando medio de cultivo Mc Coy's 5A, se incuba durante 24 horas a 37 °C. A continuación, se retira el medio de cultivo, y las células se incuban con los compuestos por 24 horas en concentraciones de 80, 40, 20, 10 y 5 µM por triplicado, además de los correspondientes controles: medio de cultivo con y sin MTT y DMSO 0,5%. Posteriormente, se evalúa la viabilidad celular midiendo la reducción del MTT a formazán, mediante la acción de reductasas celulares. Para lo siguiente, se agrega una solución de MTT 5 mg/mL en PBS y se incuba durante 4 horas. Por último, se retira el medio y se adiciona DMSO, con el fin de disolver los cristales de formazán. Se mide la absorbancia a 560 nm en lector de ELISA y se procesan los datos. El ensayo se realiza por triplicado.

Posteriormente, se realizaron estudios de la capacidad sensibilizadora de los compuestos a diferentes dosis en presencia de cisplatino 20 µM. Como control se

incluye medio de cultivo en presencia/ausencia de cisplatino 20 μM . Los resultados, luego del correspondiente tratamiento de datos, se muestran en el mismo gráfico donde se puede observar el porcentaje de inhibición de crecimiento en función de la concentración de compuesto en presencia y ausencia de cisplatino (**Figura 24**). Por otra parte, en la **tabla 2** se observan los IC_{50} en presencia y ausencia de cisplatino 20 μM .

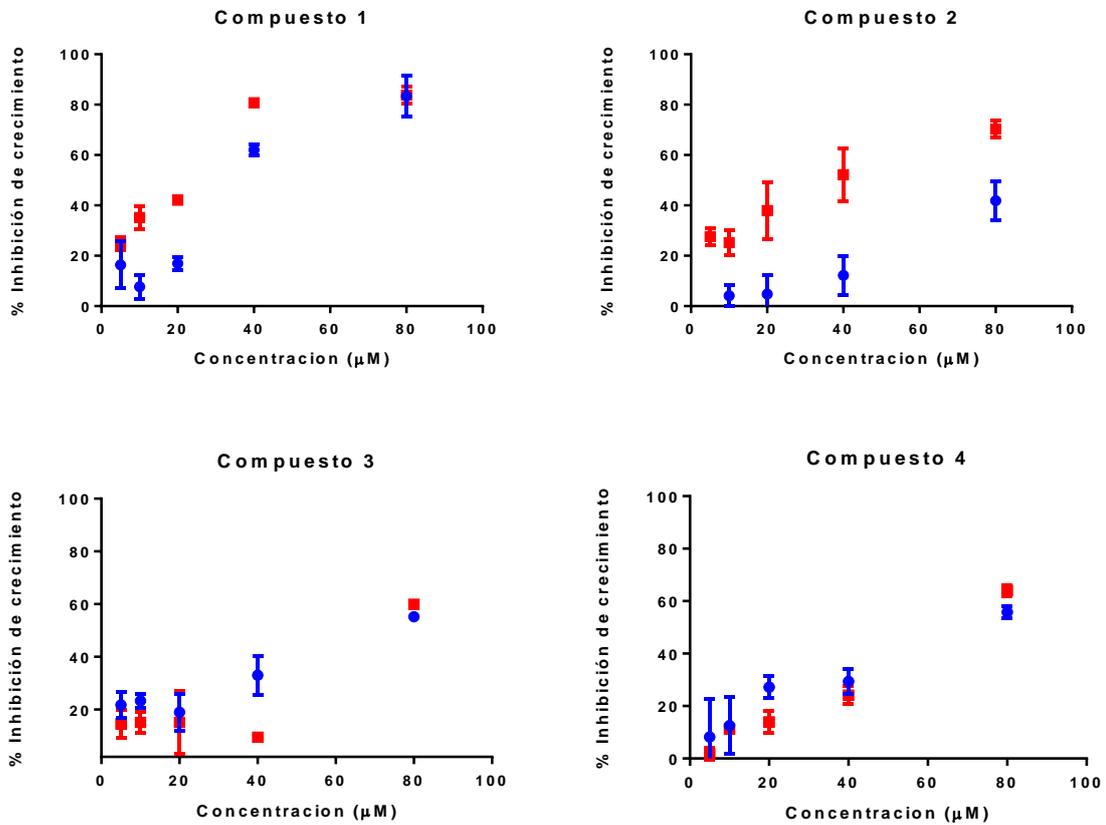


Figura 24. Actividad antiproliferativa en células U-2 OS en función de la concentración para los diferentes compuestos (azul), y **actividad sensibilizadora** de los compuestos en presencia de 20 μM de cisplatino (rojo).

Tabla 2. Valor IC₅₀ de los diferentes compuestos en presencia y ausencia de cisplatino e índice de selectividad.

	IC ₅₀ (μM)			Índice de selectividad	
	U-2 OS		V79	IC ₅₀ V79/ IC ₅₀ U-2 OS	
Cisplatino	+	-		+	-
Compuesto					
1	17,50	35,92	16,74	0,957	0,466
2	29,93	>80	>80	> 2,67	---
3	>80	65,85	56,80	---	0,863
4	78,28	70,32	>80	> 1,02	> 1,13

Discusión

En la **figura 23** se ha graficado el porcentaje de viabilidad (%) en función de diferentes concentraciones (μM) de cada compuesto en la línea celular V79. Puede observarse que el compuesto **1** es el más citotóxico, lo cual se refleja en el valor de IC₅₀, que para este compuesto es el menor observado (16,74 μM) y según la FDA, el IC₅₀ representa la concentración de un fármaco que es requerida para obtener un 50% de inhibición *in vitro*. Le sigue el compuesto **3** con un IC₅₀ de 56,80 μM. El IC₅₀ para **2** y **4** se estima como >80 μM.

En la **figura 24** pueden observarse gráficos del porcentaje de inhibición (%) en función de la concentración (μM) de cada uno de los compuestos en presencia o ausencia de cisplatino, para la línea celular U-2 OS. De esta manera, se pretende determinar si los compuestos poseen actividad sensibilizadora tomando como referencia a un fármaco como el cisplatino. Si los mismos son capaces de incrementar la actividad citotóxica en presencia del mismo, serán sensibilizadores.

En ausencia de cisplatino (azul), se observa que el compuesto **1** alcanza mayores porcentajes de inhibición de crecimiento que el resto a concentraciones más bajas. Le sigue el **3**. Los compuestos **2** y **4** tienen bajo porcentaje de inhibición de crecimiento, inclusive a altas concentraciones. En presencia de cisplatino, Se observa que los porcentajes de inhibición de **3** y **4**, no varían respecto a los obtenidos en ausencia de cisplatino. El compuesto **1** varía en presencia/ausencia de cisplatino a bajas concentraciones. La variación es más significativa aún en el caso de **2**, donde se observa que aumenta el porcentaje de inhibición en presencia de cisplatino, y que el gráfico presenta el mismo comportamiento, ya que el porcentaje de inhibición aumenta proporcionalmente a cada una de las concentraciones del mismo en presencia de cisplatino, lo que sugeriría que el mismo podría actuar como sensibilizador de esta línea celular. Por otra parte, en la **tabla 2** se muestran los IC₅₀ de los diferentes compuestos en presencia y ausencia de cisplatino. Aquí se comprueba lo mencionado anteriormente,

ya que para el compuesto **2**, se observa que el IC_{50} en presencia de cisplatino disminuye considerablemente, lo cual significaría que a menor concentración del mismo, se inhibe al 50% de las células. En el compuesto **1** también disminuye, aunque en menor grado. En el caso del compuesto **4** la curva dosis-respuesta mantiene el mismo comportamiento y el compuesto **3** en presencia de cisplatino es levemente menos activo que en ausencia del quimioterápico.

En la **tabla 2** también puede observarse el índice de selectividad, el cual se calcula como $IC_{50} V79 / IC_{50} U-2 OS$ en presencia y ausencia de cisplatino. A partir de éste se pudo determinar que el compuesto que presenta mayor selectividad es el **2** en presencia de cisplatino, el resto de los compuestos presentan un IS en torno a 1, por lo que desafortunadamente no son selectivos, independientemente de la presencia o ausencia de cisplatino.

Es posible observar que el derivado selectivo **2**, no posee un efecto electrónico sobre el anillo de fenazina con respecto a los demás, por la ausencia de un sustituyente en la posición 7 u 8. En ese sentido sustituyentes con un efecto electrón dador más marcado como los derivados **1** y **3**, muestran un comportamiento que tiende a la mayor toxicidad en células mamíferas, mientras que el derivado **4**, con un efecto electrón atrayente más marcado resulta menos citotóxico en ambas líneas celulares. Una posible explicación podría surgir de estudiar el posible efecto estero-electrónico de los sustituyentes del anillo, asociado al mecanismo de acción de los mismos por ejemplo considerando un posible efecto sensibilizador por inhibición de las HDACs.

Fundamento de la técnica 2: Western blot

Western blot es una técnica bioquímica que permite la detección de proteínas específicas de una muestra, inmovilizadas en membranas de nitrocelulosa o PVDF. Combina la electroforesis con el inmunoensayo y los niveles de proteína son cuantificados mediante densitometría. Se utiliza el programa Image J para cuantificar la intensidad de las bandas.

En este ensayo, las proteínas se separan por tamaño utilizando un gel de electroforesis SDS-PAGE y luego son transferidas a la membrana PVDF. La membrana es tratada con solución bloqueante, luego con anticuerpo primario para detectar la proteína blanco y por último, con anticuerpo secundario para revelar.⁵⁰

En nuestro ensayo, se ha utilizado la línea celular U-2 OS buscando determinar los niveles de histona H4 acetilada (H4ac), para lo cual se utiliza un anticuerpo primario anti-histona H4ac y un anticuerpo secundario que se une a la misma y se encuentra acoplado a una enzima Peroxidasa de rábano (Horseradish peroxidase, HRP), cuya unión al sustrato produce una reacción quimioluminiscente capaz de ser detectada en film fotográfico. La membrana se reutiliza incubándola con anticuerpo primario anti-histona H4 total y con el anticuerpo secundario utilizado en el caso anterior. El ensayo se realiza dos veces y se muestran los resultados de uno de ellos en las **figuras 25 y 26** y los de la cuantificación en la **figura 27**.



Figura 25. Wester blot Histona H4 total, donde: 1- DMSO, 2- TSA, 3- Compuesto 1, 4- Compuesto 2, 5- Compuesto 3, 6- Compuesto 4, 7- DMSO y 8- TSA.

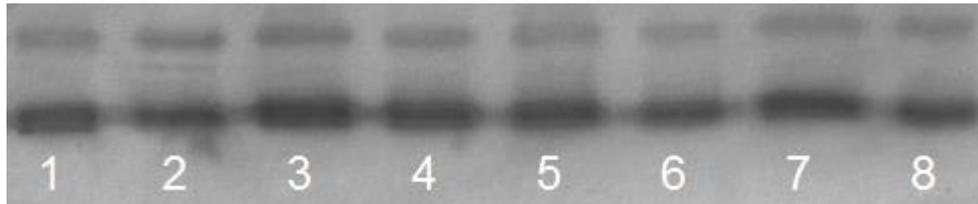


Figura 26. Wester blot Histona H4 total, donde: 1- DMSO, 2- TSA, 3- Compuesto 1, 4- Compuesto 2, 5- Compuesto 3, 6- Compuesto 4, 7- DMSO y 8- TSA.

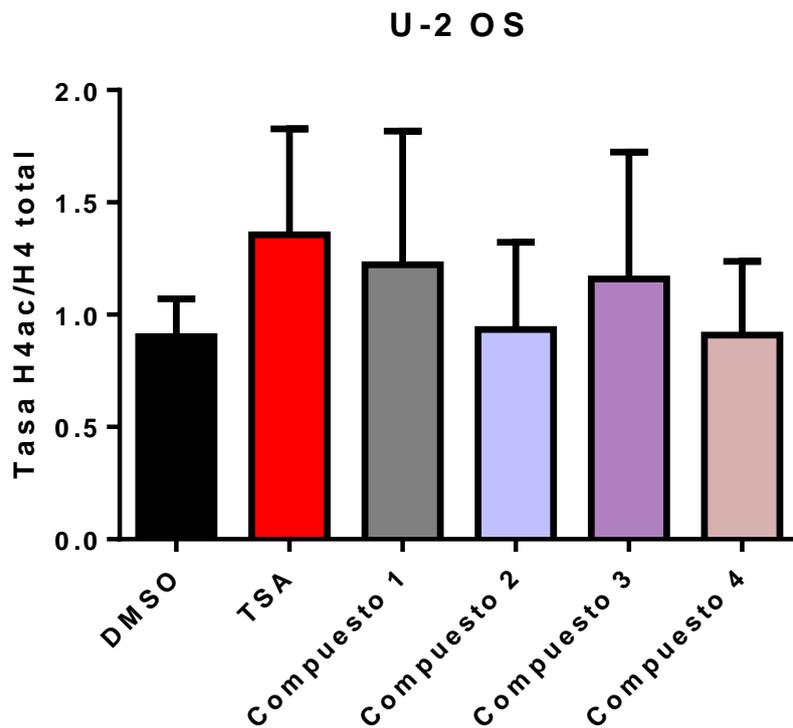


Figura 27. Tasa de Histona H4 acetilada/Histona H4 total para los diferentes compuestos, el control positivo (TSA) y el control negativo (DMSO). Se grafica la media + - el desvío estándar de dos ensayos western blot.

Discusión

En el ensayo de western blot realizado se determinan los niveles de histona H4 acetilada. Cuanto mayor sea el nivel de histona H4 acetilada registrado, tanto mayor será la inhibición de HDACs por parte de los compuestos. Se analiza la cantidad de histona H4 acetilada respecto a la histona H4 total. De esta manera, calculando la tasa de Histona H4 acetilada/Histona H4 total, se determina el nivel de acetilación respecto al nivel de la proteína histona H4 total. Para este experimento, se utiliza como control negativo DMSO, disolvente de los compuestos que no debería presentar inhibición y como control positivo TSA, que como se ha mencionado en la introducción, es apropiado como control por tratarse de un inhibidor de desacetilasas de histona.

En las **figuras 25 y 26** se muestran los resultados del revelado del ensayo western blot para histona H4 acetilada e histona H4 total, respectivamente. Se observan carriles correspondientes a los cuatro compuestos sintetizados: **1, 2, 3 y 4**, al DMSO y al TSA. La cuantificación puede observarse en la **figura 27**. El gráfico muestra la tasa de histona H4 acetilada/histona H4 total para los diferentes compuestos y controles anteriormente mencionados. Se observa, tal y como se esperaba que el TSA presenta mayor tasa de acetilación que el DMSO. Los compuestos **1 y 3** también presentaron mayor tasa de acetilación que el DMSO, pero menor que el TSA, por lo tanto, los mismos presentan actividad inhibitoria de HDACs. Los compuestos **2 y 4** presentaron una tasa de inhibición muy similar a la obtenida con el DMSO, lo cual significa que no son capaces de inhibir HDACs.

Es posible observar que los derivados con sustituyentes con un efecto electrón dador como el átomo de bromo y sustituyente metilo poseen un efecto inhibitorio mientras que derivados que carecen de tal efecto -o poseen un efecto electrón dador menos marcado en su estructura- como el derivado con un átomo de fluor, resultan con menor o casi nula actividad inhibitoria. De esta observación se depende que es posible un efecto electrónico dador sobre el agrupamiento hidrofóbico, el anillo de fenazina, que pueda estar contribuyendo a su posicionamiento en el sitio activo de la enzima y por ende permita una mejor inhibición de la enzima.

En este sentido, sería interesante realizar el modelado molecular de estos compuestos con la enzima a los efectos de estudiar como el posible efecto estero-electrónico de los sustituyentes pueden influir en tal posicionamiento en el sitio activo y realizar un rediseño de los compuestos incluyendo sustituyentes que puedan potenciar la actividad inhibitoria de los derivados de fenazina.

Nuestro próximo paso será determinar si estos compuestos son capaces de inhibir las HDACs tipo IIa, en particular la HDAC7. Estas proteínas presentan muy baja actividad enzimática contra las lisinas acetiladas, pero son necesarias para la actividad desacetilasa de las HDACs de clase I, ya que actúan reconociendo e interpretando el código de histonas dirigiendo el estatus epigenético gracias a su capacidad de reclutar enzimas adicionales para la actividad desacetilasa

Conclusiones

- Fue posible obtener derivados de derivados de *N,N'*-dióxido de fenazina , con rendimientos moderados.
- Los compuestos **1** y **3** poseen actividad inhibitoria de HDACs, siendo la misma menor a la del control (TSA). Los compuestos **2** y **4** fueron inactivos.
- El compuesto **2** en presencia de cisplatino mostró un mayor porcentaje de inhibición a todas las concentraciones, por lo que éste es el único compuesto sensibilizador.

Perspectivas

- Síntetizar otros derivados de *N,N'*-dióxido de fenazina, diseñados como potenciales inhibidores de HDACs.
- Evaluar los compuestos en condiciones de hipoxia en ambas líneas celulares con el fin obtener datos precisos sobre la selectividad de los mismos.
- Determinar los niveles de acetilación de histonas en condiciones de hipoxia.
- Evaluar si los compuestos presentan actividad como inhibidores de HDACs de clase II en normoxia e hipoxia.
- Realizar otros estudios que nos permitan determinar si los compuestos son capaces de inhibir la enzima HDAC7. Especialmente, sería interesante evaluar al compuesto **2** frente a la misma, ya que demostró actuar como sensibilizador.
- Determinar la capacidad de inhibir los niveles de expresión de HIF-1.

Bibliografía

- 1- Alberts, B; Bray, D; Lewis, J; Raff, M; Roberts, K; Watson, J. "Biología Molecular de la Célula". 5º ed, cap. 20. Ediciones omega. 1205. 2010.
- 2- Alberts, B; Bray, D; Lewis, J; Raff, M; Roberts, K; Watson, J. "Biología Molecular de la Célula". 5º ed, cap. 20. Ediciones omega. 1206. 2010.
- 3- Alberts, B; Bray, D; Lewis, J; Raff, M; Roberts, K; Watson, J. "Biología Molecular de la Célula". 5º ed, cap. 20. Ediciones omega. 1209. 2010.
- 4- Alberts, B; Bray, D; Lewis, J; Raff, M; Roberts, K; Watson, J. "Biología Molecular de la Célula". 5º ed, cap. 20. Ediciones omega. 1230. 2010.
- 5- J.E. Visvader. "Cells of origin cancer" *Nature*.469, 314. 2011.
- 6- Devita, V.; Lawrence, T.; Rosenberg, S. "Cancer, Principles and Practice of Oncology". 9º ed, chapter 1. 2011.
- 7- Liefers, G.J. "Cancer genetics and their application to individualized medicine". *Elsevier*.38, 872. 2002.
- 8- http://www.asturias.es/Astursalud/Articulos/AS_%20Noticias%20Gabinete/Agenda%202011/OMS/C_inte_cancer.pdf (julio 2015)
- 9- <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/>
- 10- http://www.comisioncancer.org.uy/categoria_53_1.html (julio 2015)
- 11- Devita, V; Chu, J. E. "Principles of Cancer Chemotherapy" Chapter 1. http://samples.jbpub.com/9781284026856/9781284026856_CH01_001_004.pdf (julio 2015)
- 12- Ainsler, J. "Overview of the changing paradigm in cancer treatment: Oral chemotherapy" *Symposium*.64, 54. 2007.
- 13- Monneret, C. "Platinum anticancer drugs. From serendipity to rational design" *ELSEVIER*.69, 286. 2011.

- 14- Flood, A. "Síntesis y evaluación biológica in vitro de compuestos de coordinación [Cu(4,7-dimetil-1, 10-fenantrolina)(N-O)]NO₃ (Casiopéínas) en diferentes líneas tumorales humanas". Tesis de grado. Universidad de las Américas Puebla. Escuela de Ingeniería y Ciencias. México. 2006.
- 15- Lavaggi, M.L; Cabrera, M; González, M; Cerecetto, H. "Differential enzymatic reductions governing the differential hypoxia-selective cytotoxicities of phenazine 5,10-dioxides". *Chemical Research Toxicology*, 21, 1900. 2008.
- 16- 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. "Phenazine 5,10-Dioxide derivatives as hypoxic selective cytotoxins. Part II. Structure-activity relationship studies". *Med. Chem.* 2, 511. 2006.
- 17- Cerecetto, H; González, M; Lavaggi, M.L; Azqueta, A; Ezpeleta, O; López de Ceraín, A; Monge-Veja, A. Phenazine 5,10-dioxide derivatives as hypoxic selective cytotoxins. *J. Med. Chem.* 48, 21. 2005.
- 18- Cerecetto, H; González, M; Lavaggi, M.L. "Development of hypoxia selective cytotoxins for cancer treatment: an update". *Med. Chem.* 2, 315. 2006.
- 19- Lavaggi, M.L; Nieves, M; Cabrera, M; Olea-Azar, C; López de Ceráin, A; Monge, A; Cerecetto, H; González, M. "Structural modifications on the phenazine *N,N'*-dioxide-scaffold looking for new selective hypoxic cytotoxins". *Eur. J. Med. Chem.* 45, 5362. 2010.
- 20- Rohwer, N; Cramer, T. Hypoxia-mediated drug resistance: "Novel insights on the functional interaction of HIFs and cell death pathways". *Elsevier*. 191. 2011.
- 21- Yan, X; Hyun-Kyung; C, Kyeong, L. "Recent advances in hypoxia-inducible factor (HIF)-1 inhibitors". *European Journal of Medicinal Chemistry*. 49, 24. 2012.
- 22- Cosse, JP; Michiels, C. "Tumor hypoxia affects the responsiveness of cancer cells to chemotherapy and promotes cancer progression". *Anti-cancer agents in Medicinal Chemistry*. 8, 790. 2008.
- 23- Drummond, D. "Clinical development of histone deacetylase inhibitors" *J Cell Biochem.* 96, 293. 2005.
- 24- Lindemann, R; Gabrielli, B; Johnstone, R. "Histone-deacetylase inhibitors for the treatment of cancer" *Cell Cycle*. 3, 799. 2004.

- 25- Bhalla, K. "Epigenetic and chromatin modifiers as targeted therapy of hematologic malignancies" *J Clin Oncol.* 23, 3971. 2005.
- 26- Garcia, M; Castro, G; Menéndez, G; García, P; Ferragut, J.A; Saceda, M. "Trichostatin A effects in different drug-resistant tumor cell lines" *Av Diabetol.* 18, 175. 2002.
- 27- Dell'Aversana, C; Lepore, I; Altucci, L. "HDAC modulation and cell death in the clinic". *Experimental cell research.* 318, 1229. 2012.
- 28- Witt, O. "HDAC family: What are the cancer relevant targets?" *Cancer Lett.* 277, 8. 2009.
- 29- Tran, T.L.H; Do, T.M.D; Dao, T.K.O; Tran, T.B.L; Phan, T.P.D; Duc, V; Vim, Kyung; Byung, W; Yun, J; Soon, J; Youngsoo, K; Sang-Bae, H; Nguyen-Hai, N. "5-Aryl-1,3,4-Thiadiazole-Based Hydroxamic Acids as Histone Deacetylase Inhibitors and Antitumor Agents: Synthesis, Bioevaluation and Docking Study" *Medicinal Chemistry.* 11, 296. 2015.
- 30- Di Micco, S; Giovanna Chini, M; Terracciano, S; Bruno, I; Riccio, R; Bifulco, G. "Structural basis for the design and synthesis of selective HDAC inhibitors". *Bioorganic & Medicinal Chemistry.* 21, 3795. 2013.
- 31- Schuetz, A; Min J; Allali-Hassani, A; Schapira, M; Shuen, M; Loppnau, P; Mazitschek, R; Kwiatkowski, N.P; Lewis, T.A; Maglathin, R.L; McLean, T.H; Bochkarev, A; Plotnikov, A.N; Vedadi, M; Arrowsmith, C.H. "Human HDAC7 harbors a class IIa histone deacetylase-specific zinc binding motif and cryptic deacetylase activity". *J Biol Chem.* 25, 283. 2008.
- 32- Chen, L; Endler, A; Shibasaki, F. "Hypoxia and angiogenesis: regulation of hypoxia-inducible factors via novel binding factors". *Experimental and Molecular Medicine.* 12, 854. 2009.
- 33- Cerecetto, H; Gonzalez, M. "N-Oxides as hypoxia selective cytotoxins" *Mini Review in Medicinal Chemistry.* 1, 219. 2001.
- 34- Brown, J.M. "(tripazamine): a new anticancer drug exploiting hypoxia in solid tumours". *British Journal of Cancer.* 67, 1163. 1993.
- 35- Matthew, M; Coleman, N; Mitchell, J. "Sensitizers and protectors of radiation and chemotherapy" *Current problems in Cancer.* 25, 333. 2001.

- 36- Michod, D; Widmann, C. "DNA-damage sensitizers: Potential new therapeutical tools to improve chemotherapy" *EL SEVIER*. 63, 160. 2007.
- 37- Sedlacek, H. "Mechanisms of action of flavopiridol" *El Sevier*. 38, 139. 2001.
- 38- Mahato, R; Tai, W; Cheng, K. "Prodrugs for improving tumor targetability and efficiency". *Advanced Drug Delivery Reviews*.63, 659. 2011.
- 39- Beumer, J.H; Tawbi, H. "The role of histone deacetylases and their inhibitors in cancer biology and treatment". *Curr. Clin. Pharmacol*. 5, 196. 2010.
- 40- Bassett, S; Barnett, M. "The role of dietary histone deacetylases (HDACs) inhibitors in health and disease" *Nutrients*. 6, 4273. 2014.
- 41- Jones, P.A; S.B. Baylin, "The epigenomics of cancer Cell". 128, 683. 2007.
- 42- Ellis, L; Hammers, H; Pili, R. "Targeting tumor angiogenesis with histone deacetylase inhibitors". *Cancer Lett.* 8, 145. 2009.
- 43- Hee, W.S; Eun, J.K; Hyelin, N; Mi, O.L. "transcriptional activation of hypoxia-inducible factor-1 α by HDAC4 and HDAC5 involves differential recruitment of p300 and FIH-1". *FEBS letters*, 583, 55. 2009.
- 44- Lafon-Hughes, L; Di Tomaso, M.V; Médez-Acuña, L; Martínez-López, W. "Chromatin-remodelling mechanisms in cancer". *Mutat. Res. Rev.* 658, 191. 2008.
- 45- Cerecetto, H; Gonzalez, M; Lavaggi, M.L; Porcal, W. "Preparation of phenazine *N,N*-dioxides. Effects of benzofuroxan substituents in the outcome of their expansion reaction with phenolates" *Journal of the Brazilian Chemical Society*. 15, 1290. 2005.
- 46- Haddadin, M.J; Issidorides, C.H. "The Beirut reaction". *Heterocycles*. 35, 1503. 1993.
- 47- Stratford, I.J; Stephens, M.A. "The differential hypoxic cytotoxicity of bioreductive agents determined in vitro by the MTT assay" *Radiation Oncology Biol.* 16, 973. 1989.
- 48- Meerloo, J; Kaspers, G.J.L; Cloos, J. "Cell sensitivity Assays: the MTT assay" *Cancer Cell Culture Methods in Molecular Biology*. 731, 237. 2011.
- 49- Twentyman, P.R; Luscombe, M. "A study of some variables in tetrazolium dye (MTT) based assay for cell growth and chemosensitivity" *British Journal of Cancer*. 56, 279. 1987.

50- Jin, S; Kennedy, R.T. "New developments in western blot technology" *El Sevier*. 26, 416. 2015.