



**FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE**

TRABAJO FIN DE GRADO

FÁRMACOS QUE CONTIENEN EL GRUPO FUNCIONAL NITRO. ANTINEOPLÁSICOS

Autor: Elena Garrido Sanz

Fecha: Junio 2020

Tutor: María Loreto Salazar Martínez de Pisón

ÍNDICE

1. RESUMEN	2
2. INTRODUCCIÓN	2
3. OBJETIVOS	4
4. MATERIAL Y MÉTODOS	4
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	4
5.1 TOXICIDAD	4
5.2 PROFÁRMACOS	7
5.3 FÁRMACOS	14
6. CONCLUSIÓN	18
7. BIBLIOGRAFÍA	19

1. RESUMEN

El cáncer es una patología caracterizada por la proliferación celular descontrolada que suscita una gran preocupación en la población actual debido a que si no recibe tratamiento suele conducir a la muerte del paciente. En la búsqueda continua de nuevos modelos farmacológicos eficaces para su tratamiento cobran una especial importancia los fármacos que contienen el grupo nitro en su estructura. La utilización terapéutica de compuestos nitrados en el diseño de fármacos está sujeta a una gran controversia debido a su capacidad de actuar como un compuesto tóxico, sin embargo son precisamente las propiedades químicas asociadas a la generación de especies reactivas las que sitúan al grupo nitro como un factor importante en algunos fármacos quimioterápicos y radioterápicos.

Entre las estrategias seguidas para el diseño de compuestos nitroderivados eficaces se encuentra la bioactivación reductora, basada en la capacidad de profármacos que contienen un grupo nitro en su estructura de ser reducidos metabólicamente en el lugar de acción. La liberación del compuesto activo puede producirse mediante la fragmentación y liberación del citotóxico o como consecuencia de la transformación del bioprecursor. En otras ocasiones el fármaco administrado no requiere un proceso de activación ya que el grupo nitro en sí mismo es capaz de interactuar con estructuras celulares impidiendo la progresión tumoral.

2. INTRODUCCIÓN

CÁNCER

Cáncer es el nombre que recibe un conjunto de enfermedades interrelacionadas que se caracterizan por presentar una proliferación descontrolada de las células del organismo, proceso polifásico denominado carcinogénesis. Inicialmente se suceden una serie de mutaciones que derivan en la aparición de células iniciadas con un crecimiento desequilibrado. Como consecuencia de la acumulación de daños en el material genético celular se produce la fase de promoción en la que las células, además de aumentar en número y dimensiones, adquieren la capacidad de infiltrarse en los tejidos cercanos e invadir zonas más lejanas (metástasis) ^[1]. La aparición de estas células cancerosas puede deberse a cambios genéticos que afectan principalmente a los proto-oncogenes, genes supresores de tumores y genes reparadores del ADN, o puede sucederse por la exposición a agentes carcinógenos externos tales como radiaciones UV, metales pesados, hidrocarburos aromáticos policíclicos, etc. ^[1,2].

La evolución en los tumores sólidos conlleva la aparición de regiones con falta de oxígeno lo que se traduce en un grave empeoramiento del pronóstico. Estas zonas hipóxicas, caracterizadas por una mayor infiltración y progresión tumoral, presentan una mayor resistencia frente a la radioterapia y la quimioterapia, representando un objetivo atractivo en la investigación de fármacos eficaces frente a tumores sólidos ^[3].

En cuanto al tratamiento del cáncer, encontramos una gran variedad en tipos de fármacos y las orientaciones terapéuticas de los mismos.

En este trabajo nos vamos a centrar en distintas estrategias terapéuticas de fármacos que tienen un grupo nitro fundamento de su actividad biológica, bien por sufrir reducción selectiva o por ser responsable de las interacciones del fármaco con su diana.

GRUPO NITRO

El grupo nitro es considerado un grupo funcional versátil ya que posee una fuerte capacidad de atraer electrones, creando zonas de deficiencia electrónica en las moléculas y favoreciendo que dichas moléculas interaccionen con nucleófilos [4].

La fuerte electronegatividad del grupo nitro proviene de la acción combinada de los dos átomos de oxígeno fuertemente electronegativos, unidos al átomo de nitrógeno parcialmente positivo. En los compuestos nitroaromáticos, el grupo nitro es capaz de deslocalizar los electrones π del anillo aromático satisfaciendo su propia deficiencia de carga y generando posiciones electrofílicas en otra zona de la molécula. Tanto el estado de conjugación como las propiedades de resonancia del grupo nitro unido a anillos aromáticos hacen que actúe como un grupo fuertemente desactivante en el ataque por electrófilos. Esto no solo proporciona carga a la molécula, sino que confiere propiedades únicas que hacen del grupo nitro un grupo funcional importante en la síntesis química. Además, cuando los compuestos aromáticos con múltiples grupos nitro reaccionan con nucleófilos se pueden formar complejos estables de Meisenheimer [5].

A nivel biológico, la interacción de compuestos nitroaromáticos con una variedad de nucleófilos biológicos como proteínas, aminoácidos, ácidos nucleicos o enzimas produce cambios que pueden ser beneficiosos o perjudiciales, según el objetivo que se persiga.

A nivel molecular, estas interacciones pueden ser de adición o sustitución nucleofílica, de transferencia electrónica responsable de procesos de oxidación y reducción o bien de formación de complejos moleculares, sin la formación de enlaces covalentes [6]. Como consecuencia, los cambios biológicos que se producen pueden ser perjudiciales para todo el organismo, aunque en muchos casos existe una toxicidad selectiva, que es el fundamento de la acción quimioterápica.

Cuando un xenobiótico entra en el organismo sufre una serie de transformaciones que lo convierten en una sustancia más polar capaz de excretarse, lo que se conoce como metabolismo. En el caso de los fármacos estas reacciones se llevan a cabo principalmente en el hígado y son esenciales para evaluar su perfil tanto de seguridad como de toxicidad.

Los nitroderivados sufren reacciones de reducción mediada por complejos enzimáticos entre los que se encuentra la citocromo P-450 reductasa. Durante este proceso se generan de manera consecutiva varios intermedios (nitroso e hidroxilamina) para dar lugar finalmente a la correspondiente amina (Figura 1). Estos procesos metabólicos son los responsables de la pérdida de actividad y excreción de los fármacos tras su acción y también de la activación de los profármacos, es decir, el metabolismo es necesario tanto para la activación como para la desactivación de los compuestos antineoplásicos [7].

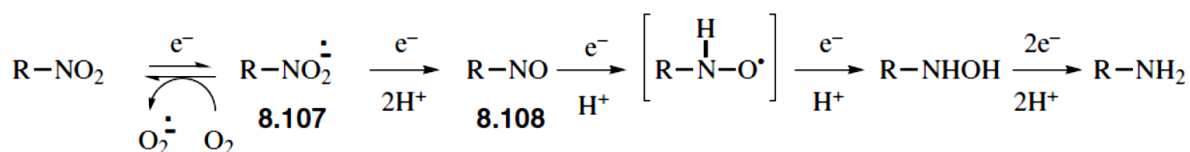


Figura 1. Mecanismo de reducción del grupo nitro [7]

Los compuestos con este grupo nitro pueden sufrir procesos químicos de bioactivación enzimática, permitiendo a estructuras nitradas actuar como profármacos inactivos que se transforman en los correspondientes fármacos y en última instancia, se suceden efectos biológicos al ser capaces de provocar la muerte celular por distintos mecanismos como inhibición de las topoisomerasas, inhibición de histonas desacetilasas, inhibición de la polimerización de tubulina o alquilación del ADN ^[4].

Los fármacos con un grupo nitro en su estructura pueden ser causantes de toxicidad severa, por ello la tendencia en el diseño de fármacos ha sido evitar este grupo. Sin embargo, se observa una toxicidad selectiva en algunos de los compuestos nitroaromáticos y nitroheteroaromáticos, que forma parte de su propio mecanismo de acción en fármacos con actividad antibacteriana, antiparasitaria y antitumoral. Esto supone el envenenamiento de las células que se desea combatir, sin perjudicar al resto de células del organismo.

Por encima de todo, los problemas que se le atribuyen a tales agentes son realmente contradictorios: el grupo nitro es considerado como un farmacóforo, pero también un toxicóforo o estructura que mantener bajo vigilancia ^[4,5].

3. OBJETIVOS

El objetivo de este trabajo es conocer, a través de una búsqueda bibliográfica, las estrategias empleadas en el diseño de fármacos con un grupo nitro y su capacidad para ser usados frente a la enfermedad del cáncer. Para ello se ha analizado la controvertida toxicidad del grupo nitro y cómo, a pesar de que este aspecto en ocasiones se considere negativo, ha permitido el desarrollo de fármacos y profármacos muy eficaces y potentes en el tratamiento de esta enfermedad.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

Se ha llevado a cabo una exhaustiva búsqueda bibliográfica en artículos científicos, literatura científica, web institucionales, revistas científicas y libros de química farmacéutica a través de plataformas tales como PubMed, ScienceDirect, Elsevier y Google Scholar. Entre las páginas web visitadas se encuentra la Asociación Española contra el Cáncer (AECC) y el National Cancer Institute (NCI).

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 TOXICIDAD

La toxicidad es uno de los principales dilemas que surgen en el uso de fármacos, y este aspecto tiene especial interés en el caso de fármacos que contienen un grupo nitro debido a su potencial carcinogenicidad, hepatotoxicidad, mutagenicidad y supresión de medula ósea. Por ello, en múltiples ocasiones estos compuestos son considerados estructuras de alerta y se bloquea cualquier exploración de su utilidad terapéutica.

La toxicidad de los fármacos y profármacos que presentan algún sustituyente nitro en su estructura aparece como consecuencia de las reacciones de oxidación y reducción durante su metabolismo, principalmente durante su reducción.

Especies reactivas de oxígeno

El estrés oxidativo se define como una alteración entre el equilibrio oxidante y antioxidante de modo que predomina la actividad oxidante y se generan alteraciones del estado redox celular. La presencia de especies reactivas de oxígeno provoca daños en los materiales biológicos, es decir, el estrés oxidativo es la consecuencia de la formación de radicales libres que ocasionan el daño celular. Durante el proceso tiene lugar una reducción gradual del oxígeno a anión superóxido, peróxido de hidrógeno, radical hidroxilo y finalmente agua.

Los nitroderivados son susceptibles de sufrir una reducción mediada por un único electrón generando estructuras radicales que pueden oxidarse y dar lugar, de nuevo, a la molécula inicial. Durante esta reoxidación el oxígeno es reducido dando lugar a anión superóxido (Figura 2). Los productos generados durante este ciclo redox son radicales reactivos provenientes del grupo nitro y la molécula de oxígeno y son susceptibles de atacar a los componentes celulares.

Estos efectos negativos se ven aún más potenciados cuando los sistemas celulares de degradación presentes en condiciones normales, como la actividad de la enzima superóxido dismutasa y la enzima catalasa, están disminuidos. Algunas de las estructuras celulares más sensibles al daño de estos radicales reactivos, mediante un proceso de peroxidación, son los lípidos poliinsaturados presentes en las membranas celulares [8].

Especies reactivas de nitrógeno

La acción genotóxica de los compuestos nitro aparece debida a una reducción en la que participan la enzima citocromo P-450 y las enzimas nitrorreductasas entre las que encontramos la NADPH citocromo C reductasa. Para que se produzca la reducción completa del grupo nitro hasta el grupo amina se requieren 6 electrones por molécula. Gracias a estudios de resonancia del espín electrónico se ha demostrado que durante el proceso se generan intermedios con electrones libres: el anión radical nitro ($R-NO_2^{\cdot-}$), el hidronitróxido ($R-NHO^{\cdot}$) y el catión radical amino ($R-NH_2^{+\cdot}$) [9]. Estas enzimas nitrorreductasas requieren una molécula de flavin mononucleótido (FMN) o una molécula de flavin-adenina dinucleótido (FAD) como grupos prostéticos y también moléculas de nicotinamida adenina dinucleótido (NADH) o nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) como agentes reductores [4].

La reducción de los grupos nitroaromáticos puede ser llevada a cabo por la enzima citocromo P-450 en presencia de NADPH, en condiciones anaerobias y también por la NADPH citocromo C reductasa.

Las diferentes etapas en la biotransformación de compuestos nitroaromáticos en aminas primarias provocan la aparición de anión radical nitro, nitroso derivados, hidronitróxido, hidroxilamina y especies reactivas de oxígeno (Figura 2). Cada uno de estos intermedios presenta una toxicidad asociada:

- La hidroxilamina y el ion nitrenio (Ar-NH^+), generado tras su protonación, son responsables de la metahemoglobinemia y el daño en el ADN al generarse interacciones covalentes con las bases de guanina.
- El efecto acumulativo del radical anión nitro, los nitroso derivados o la hidroxilamina con macromoléculas celulares provoca la aparición de la mutagenicidad y la actividad carcinogénica. Estos radicales reactivos forman aductos voluminosos con los grupos tiol libres de las proteínas celulares (nitroso derivados) y las bases de los ácidos nucleicos (hidroxilamino derivados) [10].
- La carcinogenicidad también es resultado de la aparición de especies reactivas de oxígeno (anión superóxido, peróxido de hidrógeno o radicales hidroxilo) formados durante la reoxidación del radical anión nitro que restaura el grupo nitro inicial [8,11].

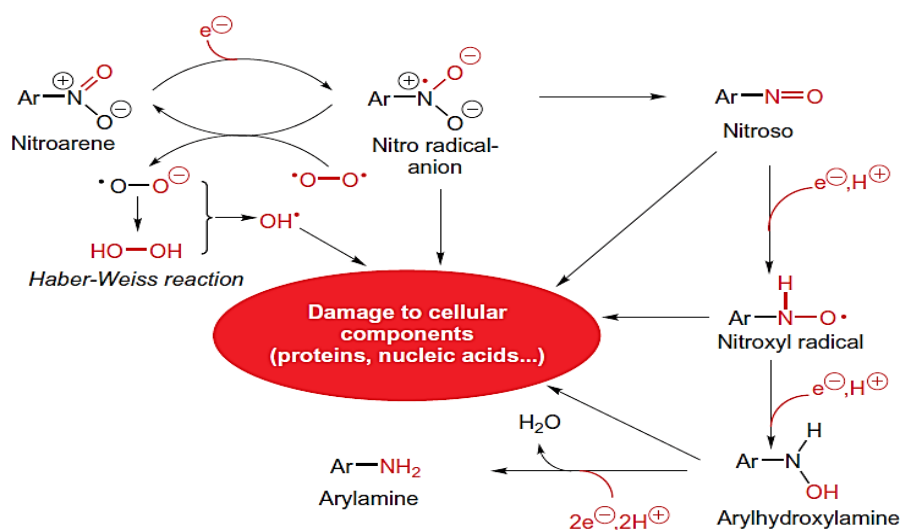


Figura 2. Toxicidad durante las transformaciones biorreductoras de los nitroareenos [8]

Dado que la reducción del grupo nitro tiene un papel esencial en la bioactivación de los nitroareenos, se puede disminuir su toxicidad alterando la orientación del grupo nitro con respecto al anillo aromático. En aquellos compuestos en los que el grupo nitro es perpendicular al sistema aromático se observa una disminución drástica en su mutagenicidad, en comparación con los análogos con un grupo nitro coplanar al anillo [12].

Actualmente algunos fármacos están siendo investigados en detalle como parte de un programa de reutilización de medicamentos que han dado fallos anteriormente, y usados como candidatos clínicos para desarrollar nuevas clases químicas. La investigación de la flutamida ejemplifica un caso en el que la estrategia del reemplazamiento bioisostérico del grupo nitro presenta beneficios. Se reemplazó el grupo nitro presente en su estructura por un grupo ciano, con el objetivo de reducir significativamente su potencial citotóxico y mantener su actividad antiandrogénica. Esta modificación se realizó para evitar la reducción del grupo nitro permitiendo la retención de un grupo aceptor de electrones. En este caso los resultados fueron bastante optimistas ya que el análogo sintetizado demostró una actividad antiandrogénica equivalente a la flutamida. Sin embargo otros estudios de reemplazo del grupo nitro han demostrado resultados fluctuantes en el contexto de la modulación de actividad y toxicidad [13].

En el grupo de los heterociclos encontramos los nitroimidazoles que se caracterizan por ser unos compuestos ampliamente utilizados en farmacología, especialmente los compuestos de 2-nitroimidazol y 5-nitroimidazol (Figura 3), pero que suscitan algunas dudas debido a su posible toxicidad. La reducción de los nitroimidazoles involucra la formación de derivados de hidroxilamina que forman enlaces covalentes con macromoléculas y se produce la muerte celular, además de presentar propiedades toxicológicas que les confieren la capacidad de provocar mutaciones. Algunos de los efectos adversos observados, principalmente en los derivados 2-nitro, son la aparición de hipersensibilidad y neurotoxicidad.

La toxicidad de estos compuestos proviene tanto de la molécula inicial como de los intermedios generados durante su proceso de reducción.

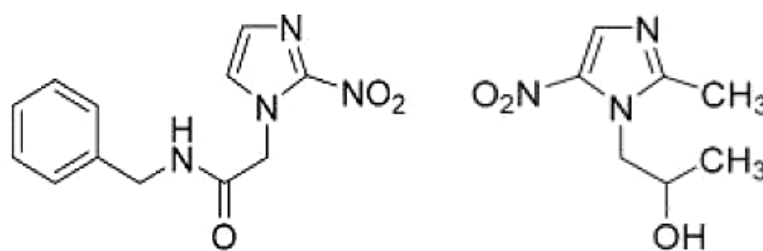


Figura 3. Compuestos con fragmentos de 2-nitroimidazol y 5-nitroimidazol ^[14]

La presencia del grupo nitro en la posición 5 del anillo parece ser esencial para la actividad terapéutica, por este motivo se ha comprobado que al realizar una protección estérica del NO₂ mediante la incorporación de sustituyentes lipófilos en las posiciones 1 y 2 se influye tanto su metabolismo como sus propiedades fisicoquímicas. Además, los compuestos con fragmentos de 2-nitroimidazol y 5-nitroimidazol resultan citotóxicos en condiciones de hipoxia debido a su capacidad de difusión a través de tejidos poco vascularizados de zonas tumorales.

Estas modificaciones químicas en los nitroimidazoles ejemplifican cómo se puede modular la toxicidad consiguiendo que sea selectiva, por ejemplo mediante la bioactivación reductiva en hipoxia, permitiendo así la actuación de los compuestos exclusivamente en las células cancerosas, lo que les confiere su utilidad terapéutica ^[14].

5.2 PROFÁRMACOS

Durante el desarrollo de tumores el suministro de oxígeno se convierte rápidamente en un factor limitante del crecimiento, debido al elevado número de células tumorales metabólicamente activas en dicha zona y a la imposibilidad de mantener un equilibrio entre la demanda y el aporte. A pesar de generarse una respuesta a este insuficiente aporte de oxígeno por la cual se desarrolla un proceso de angiogénesis creando una vasculatura tumoral, el tejido se va a encontrar en una situación de hipoxia ^[15].

Estas regiones hipóxicas presentan una mayor resistencia a procesos de radioterapia y quimioterapia al inducir factores que modulan el metabolismo tumoral, la angiogénesis, el crecimiento y la metástasis, agravando el pronóstico del paciente ^[16].

Una de las principales estrategias del tratamiento consiste en la “terapia biorreductora” basada en el uso de profármacos biológicamente inactivos que tras una reducción enzimática mediada por oxidorreductasas endógenas se transforman en fármacos citotóxicos (Figura 4). Debido a la sobreexpresión de las enzimas reductoras en el tumor el profármaco se activa mejor “in situ”.

Estos fármacos aprovechan las diferencias entre la hipoxia y la normoxia en el entorno químico para dirigir los compuestos farmacológicos a las regiones tumorales terapéuticamente comprometidas, a la vez que reducen los efectos adversos en células no hipóxicas asociados con el empleo de los agentes antitumorales convencionales [15,17].

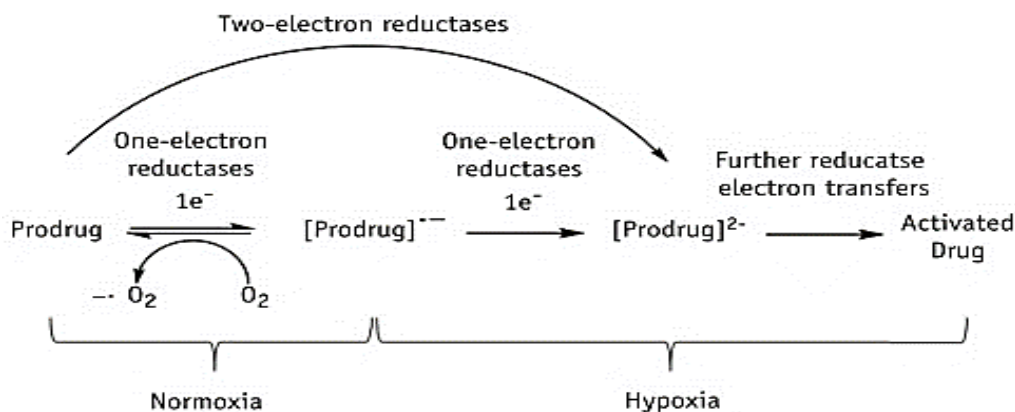


Figura 4. Terapia biorreductora: activación de profármacos en hipoxia [18]

Las enzimas implicadas pueden llevar a cabo la oxidorreducción mediante un único electrón, habiendo una reversibilidad en el proceso en presencia de oxígeno, mientras que en su ausencia continúa este proceso metabólico generándose especies citotóxicas (Figura 4). Este proceso justifica la mayor selectividad en condiciones de hipoxia. La reversibilidad mediada por el oxígeno se produce por una competición directa por el electrón del fármaco reducido inicial que previene la reducción completa del profármaco. Durante este ciclo en las células oxigenadas se generan especies reactivas de oxígeno (anión superóxido y eventualmente radicales hidroxilo), por ello existen sistemas de protección oxidativa formados por enzimas superóxido dismutasa y catalasa que detoxifican inmediatamente [19,20].

En otros casos, esta actividad enzimática está mediada por varios electrones dando lugar a una reducción total del profármaco y limitando la selectividad hipóxica. Si bien es cierto que actualmente se desconoce con exactitud el tipo de oxidorreductasa que actúa en según qué tumores, en ambos escenarios se acaba obteniendo un compuesto farmacológicamente activo. Algunos ejemplos de dichas oxidorreductasas son: citocromo P-450 oxidorreductasa, DT-diaforasa o aldo-ceto reductasas [19].

Los profármacos nitroaromáticos se biorreducen a través de la adición gradual de hasta seis electrones, proceso catalizado por varias reductasas mediante un electrón (Figura 5). El primer intermedio formado por la reducción mediante este único electrón se puede volver a oxidar en presencia de oxígeno, aunque posteriormente las reducciones son irreversibles [21].

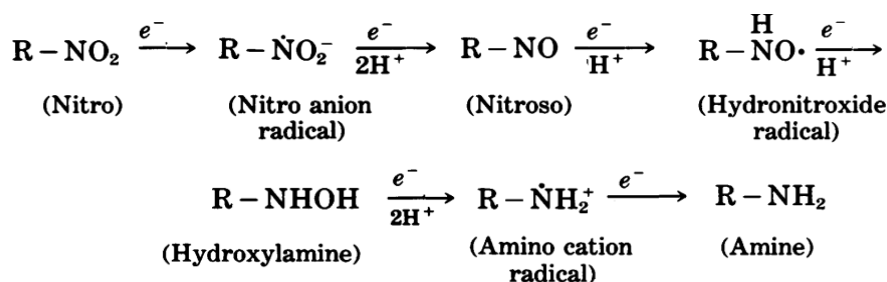


Figura 5. Esquema de la reducción completa del grupo nitro [9]

El proceso de bioactivación reductora puede dar lugar a un fármaco activo por dos mecanismos diferentes:

- Fragmentación y liberación del fármaco: el profármaco se encuentra formado por el compuesto activo y un grupo biorreducible que debe ser inactivo y no tóxico. Tras el proceso de reducción enzimática se produce la liberación del fármaco que ya puede llevar a cabo su acción terapéutica.
- Metabolización del bioprecursor: el profármaco es reducido enzimáticamente dando lugar a un nuevo compuesto activo o dando lugar a un compuesto intermedio reactivo responsable de la acción terapéutica [7].

Entre las principales características deseables de los profármacos activados selectivamente en hipoxia se encuentran: la diferencia de toxicidad entre el profármaco y el fármaco, la activación selectiva mediante reducción sensible a las concentraciones de oxígeno, la capacidad de penetración tisular a células hipóxicas distantes de la vasculatura y la difusión del fármaco una vez activado para destruir las células adyacentes [22].

Actualmente se está investigando el hecho de que los profármacos biorreducibles tengan una acción sinérgica con la radioterapia, ya que estas citotoxinas hipóxicas producen un perfil de toxicidad mayor según la distancia a los capilares sanguíneos, justo al revés que lo producido por la radiación ionizante. El daño en el ADN y la muerte celular producida por la radiación y los quimioterápicos convencionales se ven disminuidos al incrementarse la distancia del vaso sanguíneo, por contra, los profármacos con activación selectiva en situaciones de hipoxia se activan cuanto menor es el aporte de sangre oxigenada.

Por este motivo la combinación de ambas vías terapéuticas podría suponer una mayor efectividad en tratamientos con radioterapia, aunque ahora mismo está muy poco explorado a nivel clínico [18].

A continuación se muestran algunos ejemplos de estrategias para el diseño de profármacos antitumorales con un grupo nitro en su estructura:

FRAGMENTACIÓN Y LIBERACIÓN DEL FÁRMACO

Los fármacos alquilantes del ADN provocan lesiones en el material genético e interfieren en la replicación celular al formar enlaces covalentes entre los grupos alquilo y las bases nitrogenadas del ADN [23]. La ciclofosfamida es un fármaco alquilante empleado en el tratamiento del cáncer que sufre una activación hepática por la enzima citocromo P-450.

Esta oxidación metabólica convierte la ciclofosfamida en 4-hidroxiciclofosfamida para dar lugar posteriormente a la mostaza fosforamida gracias a la apertura del anillo. Esta última especie se caracteriza por ser un agente alquilante.

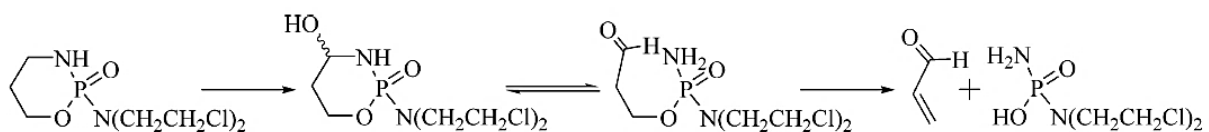


Figura 6. Mecanismo de activación de la ciclofosfamida en el hígado ^[23]

El principal objetivo en el desarrollo de profármacos de estos agentes alquilantes es sustituir la activación hepática por una activación selectiva a nivel tumoral. Con esto se consigue evitar los efectos adversos y se permite un mejor ajuste de la dosis para mejorar la efectividad y prevenir así la aparición de una toxicidad a nivel sistémico. Para ello se identifican aquellas enzimas que aparecen en una elevada concentración en células tumorales, como es el caso de las nitrorreductasas, con el fin de conseguir expresar esta enzima en las células específicas.

Los profármacos diseñados incorporan un grupo nitro dando lugar a varios análogos no cíclicos con una estructura de 4-nitrobenzilosfosfamida.

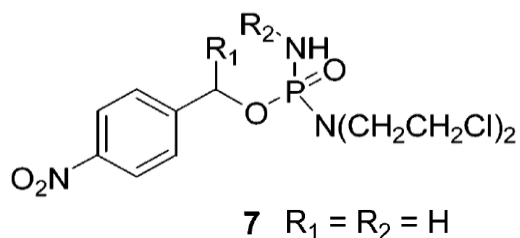


Figura 7. Estructura de los profármacos derivados de nitrobenzilosfosfamida ^[24]

El grupo nitro es un grupo atractor electrónico que reduce el potencial de oxidación de los anillos en el hígado. El mecanismo de activación está mediado por una nitrorreductasa que transforma el grupo nitro en un grupo hidroxilamino. Como consecuencia de esta bioactivación se genera un grupo donador, de modo que los electrones del nitrógeno de hidroxilamina pueden deslocalizarse hasta la posición *para* del anillo y esto provoca la escisión del enlace bencílico C-O tras el proceso de reducción. La fragmentación permite la liberación de la mostaza fosforamida activada (Figura 8).

Los intermedios generados son semejantes a la mostaza fosforamida producida durante la activación convencional, por lo que se consigue el mismo efecto antineoplásico pero esta vez selectivamente en las células tumorales. Además, estos compuestos intermedios presentan centros electrofílicos adicionales que formarán enlaces cruzados con macromoléculas funcionales proporcionando un mecanismo adicional para la citotoxicidad (Figura 8).

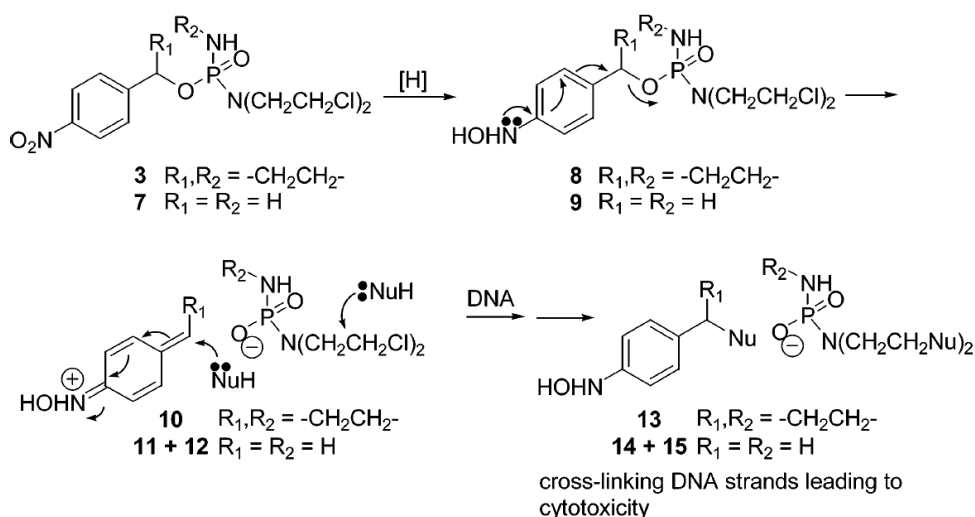


Figura 8. Mecanismo de activación de los profármacos ^[24]

El análogo acíclico de la mostaza 4-nitrobenzilosforamida originalmente fue sintetizado como un control para explorar el mecanismo de activación de los análogos cíclicos y finalmente resultó ser el compuesto más activo. De los derivados sintetizados aquellos que contienen un oxígeno bencílico en posición *para* respecto el grupo nitro presentaron una mayor citotoxicidad y selectividad en células tumorales, y representan una estrategia prometedora en el desarrollo de fármacos con una activación reductora selectiva ^[24].

La mayoría de profármacos descritos, siendo el anterior ejemplo prueba de ello, están diseñados para liberar una citotoxina que provoca un daño en el ADN. Sin embargo surge la posibilidad de sobrepasar los niveles de toxicidad, especialmente cuando se usa de manera combinada con la quimioterapia estándar. Por este motivo surge una aplicación alternativa basada en la utilización de grupos protectores biorreducibles que enmascaran fármacos que actúan como inhibidores de proteínas o inhibidores de enzimas necesarias para la progresión tumoral. De esta manera se impide que interactúe con sus dianas terapéuticas fuera del tumor y se mantiene inactivo hasta que se produce la reducción en hipoxia.

Uno de los focos de actuación de los agentes quimioterápicos es el ciclo celular ya que durante el desarrollo de tumores se produce una pérdida de control del mismo. En este caso nos centramos en la Aurora A cinasa y en el punto de control cinasa 1 (Chk1). Por un lado, la enzima Aurora A está asociada con la maduración de los centrosomas y su separación tras la formación del huso mitótico. Por otro lado, el punto de control Chk1 reconoce la inestabilidad en la cadena de ADN durante la replicación, siendo capaz de detener el proceso para que puedan actuar los mecanismos de reparación del material genético. Así se coordina la respuesta frente al daño celular.

La respuesta de estrés replicativo, observada en múltiples tipos de cáncer, se caracteriza por un aumento en la señalización ATR/Chk1, en la que tras la activación de ATR por acción de la topoisomerasa II, esta es capaz de fosforilar a Chk1 favoreciendo que continúe el ciclo celular. Por ello se han sintetizado fármacos inhibidores que se dirigen a ATR/Chk1 en células con daño en el ADN, especialmente en aquellas que han perdido el control del punto G1 mediado por p53 ^[25,26].

Uno de los profármacos más prometedores es el CH-01 activado por reducción de un grupo nitro. La unión del grupo 4-nitroencil al grupo hidroxilo terminal mantiene inactivo al inhibidor de Chk1. Cuando el compuesto se encuentra en la atmósfera hipóxica propia del tumor (0.1% O₂), el grupo nitro es reducido a nitroso o amina, formándose así un grupo donador de electrones. Estos compuestos reducidos sufren posteriormente la liberación del fármaco inhibidor de Chk1 y Aurora cinasa (Figura 9).

Al realizar este mismo estudio en presencia de oxígeno se observó que no se producía ni la reducción ni la liberación del inhibidor ya que, en este caso, tras la reducción del grupo nitro se genera un anión radical que es rápidamente oxidado por el oxígeno molecular formándose superóxido y haciendo esta ruta improductiva.

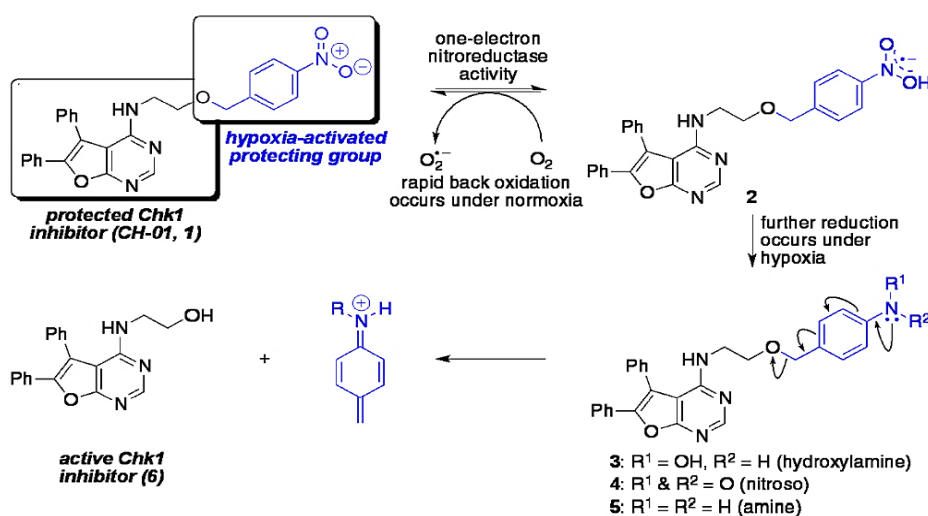


Figura 9. Mecanismo de activación de CH-01 y posterior liberación del inhibidor de Chk1 activo [26]

Una de las principales causas que llevó al desarrollo de este profármaco fue que la exposición elevada a inhibidores clásicos de Chk1 provocaba la acumulación a nivel celular de proteínas de unión al ADN ocasionando daños en el material genético, afectando a la estabilidad genómica y favoreciendo el proceso tumoral. Sin embargo en el caso del profármaco solo se produce el acúmulo de proteínas en condiciones de hipoxia.

La inhibición dual de la vía de Chk1 y de la vía Aurora A provoca una mejor inhibición de la progresión del ciclo celular, teniendo en cuenta que los niveles de daño que tenga el ADN y el estrés replicativo de la célula contribuyen a la sensibilización frente a estos fármacos. La incorporación del grupo nitro en la estructura de los profármacos asegura una citotoxicidad con selectividad en las células tumorales [26].

BIOPRECURSOR

Durante el desarrollo de compuestos con una capacidad de activación selectiva se investigó una clase de agentes monoalquilantes del ADN para el diseño de profármacos antitumorales. Estos compuestos interactúan de forma selectiva, en base a la secuencia genética, con la posición N3 de la adenina del surco menor del ADN. Se sintetizaron varios análogos a partir del compuesto citotóxico natural duocarmicina, sin embargo todos ellos resultaron tener como efecto adverso toxicidad a nivel mieloide, y al disminuir su concentración para permitir una administración sistémica se perdía la actividad antitumoral.

Estas limitaciones llevaron a la síntesis de profármacos capaces de actuar selectivamente en los tumores deseados, obtenidos mediante la sustitución del grupo hidroxilo fenólico (ceto de la quinona) por un grupo nitro obteniéndose así las nitroclorometilbenzoindolinas (nitroCBIs).

Los derivados nitroCBI se diferencian entre ellos en la incorporación de distintas cadenas de sustituyentes: 5,6,7-trimetoxindol (TMI) o 5-[(dimetilamino)etoxi]indol (DEI). Ambos resultaron ser profármacos con un gran potencial citotóxico (Figura 10).

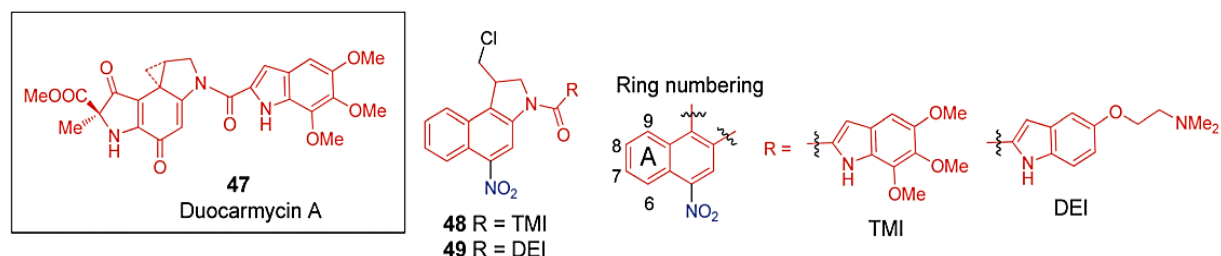


Figura 10. Estructura de la duocarmicina y los profármacos nitroCBI y los sustituyentes TMI y DEI [27]

En condiciones de hipoxia se produce la biorreducción del grupo nitro que se convierte en el correspondiente amino derivado capaz de ceder electrones y favorecer una espirociclación. La formación de este intermedio citotóxico da lugar a la aparición del agente alquilante del ADN.

El mecanismo de activación se produce debido a que el grupo nitro es un fuerte aceptor de electrones que inhibe la ciclación y la existencia de la forma activa, hasta que se produce la reducción selectiva. Tras el proceso de reducción se obtiene el grupo amino que es un grupo donador de electrones y provoca la ciclación a un anillo de ciclopropilo, análogo al presente en la duocarmicina y responsable de la alquilación del ADN (Figura 11).

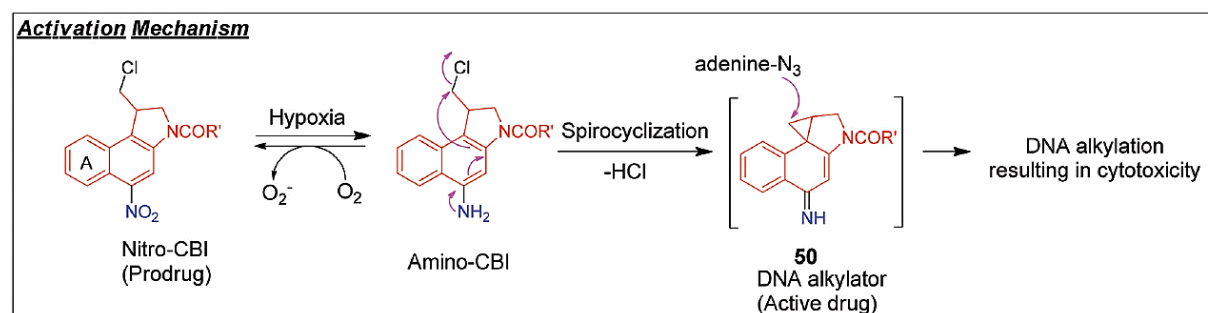


Figura 11. Mecanismo de activación del profármaco bioprecursor nitroCBI [27]

Los compuestos nitroCBI con la cadena DEI dan lugar a un metabolito activo con mayor capacidad de difusión y muy eficaz frente al cáncer de colon (líneas celulares HCT-116). Además su combinación con radioterapia provoca un aumento del doble en la toxicidad selectiva frente a tumores RIF-1.

También se demostró que cuando se incorpora un grupo aceptor de electrones en el anillo A se produce un aumento del potencial de reducción, especialmente cuando se seleccionan grupos que presentan una cadena básica y sustituyentes como los grupos carboxamida y sulfamida (Figura 12).

El análogo más prometedor resultó ser el que contenía un grupo sulfamida (SO₂NH₂) en la posición 7.

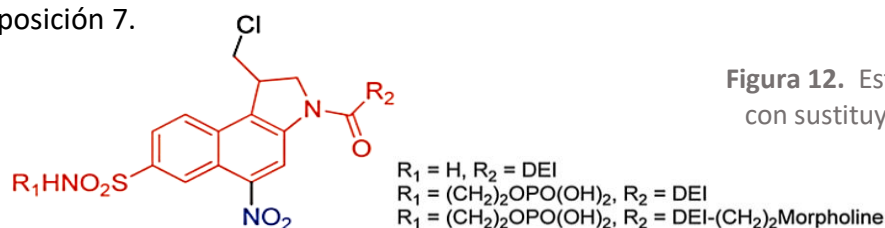


Figura 12. Estructura de los análogos con sustituyentes en el anillo A ^[27]

En este caso el mecanismo de acción seguido consiste en la presencia de grupos nitro susceptibles de bioactivarse, que se traduce en la aparición de compuestos aminoderivados que sufren transformaciones hasta generar el electrófilo reactivo idóneo para incapacitar el material genético y provocar así la muerte de células cancerosas. ^[22,27]

5.3 FÁRMACOS

A la hora de diseñar fármacos existen múltiples estrategias basadas en la capacidad de provocar efectos antitumorales por parte del grupo nitro. A continuación se muestran algunos ejemplos de fármacos en los que la presencia de un grupo NO₂ es esencial para llevar a cabo su mecanismo de acción:

RADIOSENSIBILIZADORES

La radioterapia se basa en la utilización de radiaciones ionizantes capaces de generar especies reactivas como el radical hidroxilo a partir de la lisis de moléculas de agua. Los radicales originados interaccionan con el ADN produciéndose radicales que gracias a la presencia de oxígeno, capaz de aceptar los electrones, dan lugar a un daño irreversible. Por este motivo en ausencia de oxígeno la radioterapia es menos efectiva y se ponen en marcha los mecanismos de reparación del material genético. Para intentar solucionar esta pérdida de efectividad se han desarrollado compuestos radiosensibilizadores miméticos del oxígeno, con elevada afinidad electrónica y capaces de potenciar el efecto de la radioterapia en hipoxia (Figura 13).

Estos radiosensibilizadores son compuestos nitroheterocíclicos entre los que destaca el uso de nitroimidazoles. El grupo nitro de estos compuestos, gracias a su afinidad electrónica, interacciona con el ADN dañado de forma análoga a como lo hacía el oxígeno, produciéndose la transferencia de electrones que da lugar a la formación del anión radical. Como consecuencia los daños que se producen en el ADN son irreversibles e irreparables y esto conduce a la rotura de filamentos y muerte celular.

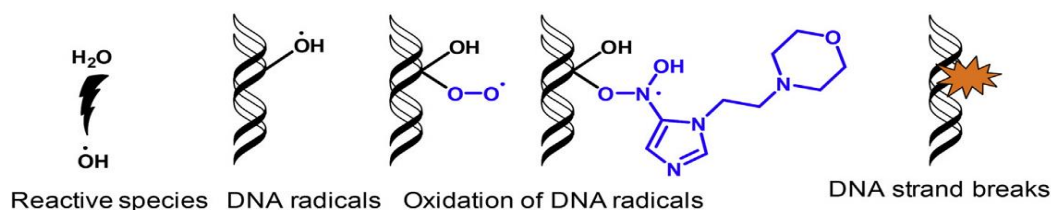


Figura 13. La radiación genera especies reactivas (ej. radical hidroxilo) a partir de agua que reaccionan con el ADN generando radicales. En presencia de oxígeno o radiosensibilizadores miméticos de oxígeno se produce la oxidación de los radicales del ADN y la posterior ruptura del mismo ^[28].

Las propiedades citotóxicas del nitroimidazol se deben tanto a la producción de intermedios reactivos nitroso e hidroxilamina, como a su capacidad de reducción.

Uno de los primeros análogos sintetizados fue el misonidazol con muy buenos resultados en su actividad como radiosensibilizador, sin embargo producía una gran neurotoxicidad.

Actualmente se están desarrollando derivados más polares modificando las cadenas laterales y modulando así sus propiedades fisicoquímicas y farmacológicas (Figura 14). Destaca entre ellos el etanidazol por presentar dos ventajas esenciales: en primer lugar su vida media más corta asegura una disminución en la toxicidad y en segundo lugar su naturaleza más hidrofílica provoca una lenta absorción en los tejidos solucionando el problema de neurotoxicidad.

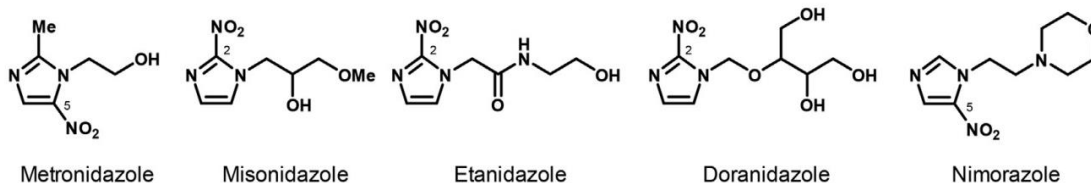


Figura 14. Estructura de nitroimidazoles empleados como radiosensibilizadores [28]

El desarrollo de radiosensibilizadores nitroaromáticos permite superar la resistencia a la radioterapia en condiciones de hipoxia y presenta resultados beneficiosos en el tratamiento del cáncer, especialmente cuando se lleva a cabo un tratamiento conjunto con radiosensibilizadores y fármacos radioterápicos clásicos [28,29].

DONADORES DE NO

La formación endógena de óxido nítrico (NO) tiene un papel fundamental en sistemas biorreguladores como la estimulación inmune y las reacciones inflamatorias. En elevadas concentraciones puede provocar un daño en macromoléculas (proteínas, ADN, lípidos), promover la muerte celular por sobrerregulación de p53, producir la inhibición de la angiogénesis o favorecer la necrosis celular. El NO generado puede reaccionar con anión superóxido produciendo peróxido nítrico y especies oxidativas dando lugar a toxicidad. Hay un gran interés en el desarrollo de agentes donadores de NO "in situ" capaces de descomponerse.

Los nitratos orgánicos (RONO₂) son compuestos capaces de liberar NO mediante un proceso que puede ser enzimático o no enzimático en el que participan 3 electrones.

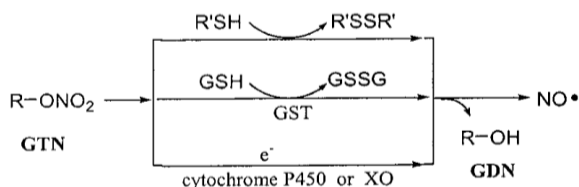


Figura 15. Liberación de óxido nítrico mediante reducción enzimática y no enzimática [30]

En el proceso no enzimático participan los grupos tioles presentes en estructuras celulares. Por otro lado, la transformación enzimática se realiza por la acción de citocromo P-450 dependiente de NADPH o la participación de isoenzimas como glutatión-S-transferasa. El óxido nítrico liberado puede interactuar con oxígeno en medio acuoso obteniéndose nitrito, o bien puede reaccionar rápidamente con el anión superóxido produciendo una especie de anión citotóxico peroxinitrilo (ONOO⁻) capaz de dañar el ADN [31].

En base a este mecanismo de acción, se desarrollaron unos fármacos híbridos formados por un donador de NO y una parte nucleosídica con el objetivo de llevar a cabo de forma simultánea una inhibición celular por dos mecanismos de acción distintos.

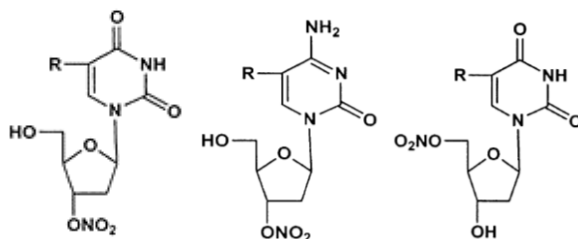


Figura 16. Fármacos con doble mecanismos de acción: donadores de NO y antimetabolitos ^[31]

Al efecto antineoplásico del NO, explicado anteriormente, se une la capacidad de inhibir la timidilato sintetasa y la ADN polimerasa, al actuar la fracción nucleosídica como un antimetabolito. Para la síntesis de estos fármacos se utilizaron fragmentos de 3'-O-nitro-2'-deoxiuridinas, 3'-O-nitro-2'-deoxicitidinas, 5'-O-nitro-2'-deoxiuridinas (Figura 16).

Este grupo de compuestos demostró que los derivados del grupo nitro, como el nitrato, pueden ser utilizados como potentes donadores de óxido nítrico con una eficacia incluso superior a los fármacos utilizados en terapias tradicionales ^[30,31].

En los ejemplos anteriormente explicados el grupo nitro es fundamental por su capacidad para aceptar electrones. Existen otros modelos en los que se aprovecha la capacidad de generarse interacciones intermoleculares gracias a la distinta densidad electrónica del fármaco nitrado y las moléculas con las que interaccionan:

INTERACCIONES DEL GRUPO NO₂:

Las ADN topoisomerasas participan en la replicación, transcripción y recombinación del material genético, procesos imprescindibles para la proliferación y supervivencia celular. Se han desarrollado inhibidores de la topoisomerasa I (TopI) cuyo mecanismo de acción se basa en el bloqueo de la enzima al quedar atrapada en un complejo covalente con el ADN.

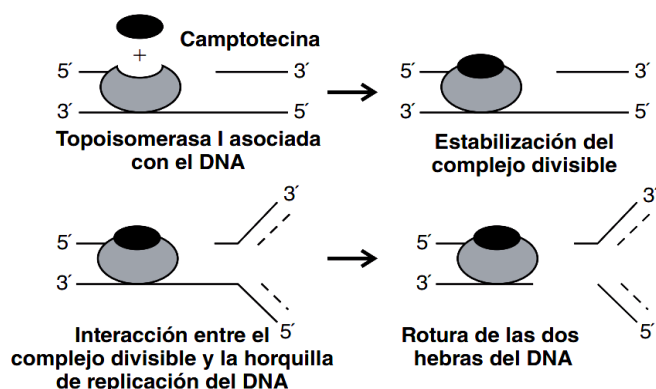


Figura 17. Mecanismo de acción de la camptotecina ^[32]

La identificación de la indenoisoquinolina (**1**, Figura 18) como inhibidor se produjo al realizar un análisis comparativo de su toxicidad con la camptotecina (**2**, Figura 18) que es un inhibidor de topoisomerasa eficaz. Estas moléculas son capaces de intercalarse entre las bases del ADN en el sitio de escisión de la hélice y esto ocasiona la formación de un complejo ternario fármaco-ADN-topoisomerasa I.

Por tanto, su mecanismo de acción se basa en el “envenenamiento” de la topoisomerasa al quedar atrapada en el complejo covalente.

Para ello se desarrollaron unos análogos de indenoisoquinolina **1** con la incorporación de un grupo nitro en la posición 3 y un grupo metoxi en la posición 9 (**3**, **4** y **5**, Figura 18).

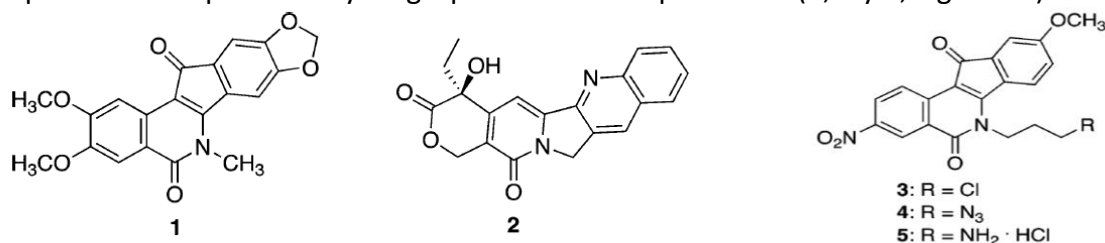


Figura 18. Inhibidores de la enzima topoisomerasa I ^[33]

Se realizó un estudio comparativo entre los derivados no sustituidos y los derivados con sustituyentes nitro y metoxi, a fin de demostrar la contribución del NO₂ y del CH₃O en la capacidad inhibitoria y la citotoxicidad de los nuevos fármacos:

- Los derivados con un grupo metoxi en la posición 9 presentaron un mejor perfil de citotoxicidad.
- Los derivados con un grupo nitro en la posición 3 no mejoraron la toxicidad selectiva respecto a los compuestos con el grupo metoxi. Sin embargo, presentaron una mejor citotoxicidad e inhibición de TopI que los derivados no sustituidos.

Estos resultados sugieren que la presencia del nitro mejora la inhibición de TopI y la presencia del grupo metoxi mejora la citotoxicidad, siendo ambos capaces de provocar efectos biológicos de manera independiente. Por ello, al sintetizar análogos que combinan ambos sustituyentes se esperaba tener una mayor potencia:

- Efectivamente los compuestos con grupos 3-nitro y 9-metoxi actúan como potentes inhibidores de la topoisomerasa I y presentan una capacidad citotóxica mayor que los demás análogos estudiados, confirmando el efecto sinérgico de dichos sustituyentes.

En cuanto a su capacidad de inhibir la actividad de Top I, estos derivados de indenoisoquinolina mostraron que a bajas concentraciones su mecanismo de acción se basa en el envenenamiento de la enzima mientras que a elevadas concentraciones actúan como supresores enzimáticos.

Para comprender la contribución del grupo nitro en estos fármacos se desarrollaron modelos teóricos por modelado molecular de los tipos de uniones establecidos y se confirmaron dos efectos beneficiosos.

En primer lugar, los átomos de oxígeno ricos en electrones presentes en el grupo nitro del compuesto **5** complementan la electrodeficiencia de los bordes exteriores de la hélice del ADN.

En segundo lugar, la naturaleza electroattractora del grupo nitro provoca una deficiencia electrónica relativa en el anillo aromático de indenoisoquinolina. Esta deficiencia se traduce en una buena complementariedad electroestática del compuesto **5** con las bases del ADN y contribuye a la estabilización del complejo mediante interacciones π -stacking.

Podemos concluir que la presencia del grupo 9-metoxi mejora la citotoxicidad y la presencia del grupo 3-nitro potencia la capacidad inhibitoria enzimática de dichos fármacos. Además, al comparar los análogos no sustituidos frente a los análogos con los dos sustituyentes se demuestra la importancia del grupo nitro al ser responsable de la formación de puentes de hidrógeno con Top1 y establecer las interacciones π -stacking con las bases del ADN [32,33].

6. CONCLUSIÓN

El grupo nitro presente en la estructura de agentes citotóxicos utilizados en la terapia frente al cáncer está relacionado con su capacidad para desarrollar una actividad antiproliferativa. Su toxicidad asociada convierte a este grupo en una señal de alerta y es la responsable del rechazo que obstaculiza, en ocasiones, su utilización. Sin embargo, es precisamente esta reactividad la clave para el desarrollo de estrategias terapéuticas eficaces.

Durante la reducción metabólica del grupo nitro se generan especies reactivas responsables de la aparición de mutagenicidad y citotoxicidad, de modo que al conseguir modular este proceso para que ocurra tan solo en las células diana, disminuyen los efectos adversos y se convierte en un tratamiento más seguro.

Es así como surge la terapia biorreductora que permite la activación de profármacos exclusivamente en las zonas tumorales con baja concentración de oxígeno. Durante la activación, el grupo atractor de electrones nitro se transforma en un grupo donador de electrones amina o hidroxilamina generándose las especies citotóxicas.

En este trabajo se muestran algunos métodos utilizados en el diseño de agentes antitumorales nitroderivados como son la fragmentación y posterior liberación del compuesto activo o la transformación del bioprecursor en el citotóxico correspondiente. El grupo nitro también forma parte de la estructura de fármacos que no requieren ser bioactivados. Su mecanismo de acción en estos casos se basa, principalmente, en la capacidad del NO₂ para aceptar electrones favoreciendo la unión irreversible a componentes celulares (material genético) y la liberación de moléculas activas como el óxido nítrico. Además, tiene un especial interés su capacidad para generar interacciones intermoleculares en base a la complementariedad de densidad electrónica generada dando lugar a la formación de complejos moleculares.

Tras lo expuesto podemos concluir que el nitro es un grupo toxicóforo y farmacóforo que nos ofrece un gran abanico de estrategias terapéuticas antineoplásicas en las que participar, siempre que se mantenga bajo control su toxicidad natural.

7. BIBLIOGRAFÍA

- [1] AECC:Asociación Española Contra el Cáncer [internet]. Madrid: AECC; [actualizado 2018; citado 9 abril 2020]. Disponible en: <https://www.aecc.es/es/todo-sobre-cancer>
- [2] NIH: National Institutes of Health: National Cancer Institute [internet]. Bethesda, MD; [Actualizado Agosto 2019, citado 6 abril 2020]. Disponible en: <https://www.cancer.gov/about-cancer>
- [3] Arvelo F, Cotte C. Hipoxia en la malignidad del cáncer. Revisión. Invest Clin. 2009;50(4):529-546.
- [4] Nepali K, Lee HY, Liou JP. Nitro-group-containing drugs. J. Med. Chem. 2019;62(6):2851-2893.
- [5] Ju KS, Parales RE. Nitroaromatic compounds, from synthesis to biodegradation. Microbiol Mol Biol Rev. 2010;74(2):250-72.
- [6] Strauss, Michael J. The nitroaromatic group in drug design. pharmacology and toxicology (for Nonpharmacologists). Ind Eng Chem Res. 1979;18(3):158-166.
- [7] Silverman RB, Holladay MW. Cap. 8 Drugs Metabolism. The Organic Chemistry of Drug Design and Drug Action. [internet]. 3º Ed. San Diego (CA): Academic Press;2014. Pag. 357-422. [actualizado 5 mayo 2020]. Disponible en: <https://ebookcentral.proquest.com/lib/universidadcomplutense-ebooks/reader.action?docID=5754489>
- [8] Macherey AC, Dansette PM. Biotransformations Leading to Toxic Metabolites: Chemical Aspect. En: Camille Georges Wermuth. The Practice of Medicinal Chemistry. 3º Ed. New York: Academic Press; 2015: 675–696.
- [9] Moreno SN, Docampo R. Mechanism of toxicity of nitro compounds used in the chemotherapy of trichomoniasis. Environ Health Perspect. 1985;64:199-208.
- [10] Wardman P. Electron transfer and oxidative stress as key factors in the design of drugs selectively active in hypoxia. Curr Med Chem. 2001;8(7):739-761.
- [11] Gross P. Biologic activity of hydroxylamine: a review. Crit Rev Toxicol. 1985;14(1):87-99.
- [12] Kalgutkar AS, et al. A comprehensive listing of bioactivation pathways of organic functional groups. Curr Drug Metabolism. 2005;6(3):161-225.
- [13] Coe KJ, Jia Y, Ho HK, Rademacher P, Bammler TK, Beyer RP, Farin FM, Woodke L, Plymate SR, Fausto N, Nelson SD. Comparison of the cytotoxicity of the nitroaromatic drug flutamide to its cyano analogue in the hepatocyte cell line TAMH: evidence for complex I inhibition and mitochondrial dysfunction using toxicogenomic screening. Chem. Res. Toxicol. 2007;20:1277–1290.
- [14] Raether W, Häne H. Nitroheterocyclic drugs with broad spectrum activity. Parasitol. Res. 2003;90(1):S19-S39.
- [15] O'Connor L, Cazares-Körner C, Saha J, et al. Design, synthesis and evaluation of molecularly targeted hypoxia-activated prodrugs. Nat Protoc. 2016;11:781–794.
- [16] Bertout JA, Patel SA, Simon MC. The impact of O₂ availability on human cancer. Nat Rev Cancer. 2008;8(12):967-75.

- [17] Ikeda Y, et al. Targeting and Treatment of Tumor Hypoxia by Newly Designed Prodrug Possessing High Permeability in Solid Tumors. *Mol. Pharm.* 2016;13(7):2283-2289.
- [18] Mistry IN, et al. Clinical Advances of Hypoxia-Activated Prodrugs in Combination With Radiation Therapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2017;98(5):1183-1196.
- [19] Guise CP, et al. Bioreductive prodrugs as cancer therapeutics: targeting tumor hypoxia. *Chin J Cancer.* 2014;33(2):80–86.
- [20] Denny WA. Hypoxia-activated prodrugs in cancer therapy: progress to the clinic. *Future Oncol.* 2010;6(3):419-428.
- [21] McKeown SR, Cowen RL, Williams KJ. Bioreductive Drugs: from concept to clinic. *Clin Oncol.* 2007;19(6):427-442.
- [22] Tercel M, et al. Hypoxia-activated prodrugs: substituent effects on the properties of nitro seco-1, 2, 9, 9a-tetrahydrocyclopropa [c] benz [e] indol-4-one (nitroCBI) prodrugs of DNA minor groove alkylating agents. *J Med Chem.* 2009;52(22):7258-7272.
- [23] Zhuorong LI, et al. Nitrobenzocyclophosphamides as potential prodrugs for bioreductive activation: synthesis, stability, enzymatic reduction, and antiproliferative activity in cell culture. *Bioorg Med Chem.* 2003;11(19):4171-4178.
- [24] Jiang Y, et al. Design, Synthesis, and Biological Evaluation of Cyclic and Acyclic Nitrobenzylphosphoramidate Mustards for E. coli Nitroreductase Activation. *J Med Chem.* 2006;49(14):4333-4343.
- [25] Chen T, Stephens PA, Middleton FK, Curtin NJ. Targeting the S and G2 checkpoint to treat cancer. *Drug Discov Today.* 2012;17(5):194-202.
- [26] Cazares-Körner C, et al. CH-01 is a hypoxia-activated prodrug that sensitizes cells to hypoxia/reoxygenation through inhibition of Chk1 and Aurora A. *ACS Chem Biol.* 2013;8(7):1451-1459.
- [27] Sharma A, et al. Hypoxia-targeted drug delivery. *Chem Soc Rev.* 2019;48(3):771-813.
- [28] Jackson RK, Liew LP, Hay MP. Overcoming Radioresistance: Small Molecule Radiosensitisers and Hypoxia-activated Prodrugs. *Clin Oncol.* 2019;31(5):290-302.
- [29] Zięba-mizgała A, et al. Electrophilic properties of nitroheterocyclic compounds.: Potential hypoxic cells radiosensitizers. *Bioelectrochemistry.* 2005;65(2):113-119.
- [30] Wang PG, et al. Nitric oxide donors: chemical activities and biological applications. *Chem Rev.* 2002;102(4):1091-1134.
- [31] Naimi E, et al. Synthesis of 3'-and 5'-nitrooxy pyrimidine nucleoside nitrate esters: "nitric oxide donor" agents for evaluation as anticancer and antiviral agents. *J Med Chem.* 2003;46(6):995-1004.
- [32] Zuckerman D, Chabner B. inhibidores de la topoisomerasa: camptotecinas, antraciclinas y etopósido. En *Harrison's Manual of Oncology.* México D.F.: Mc Graw Hill. 2009:35-48.
- [33] Morrell A, et al. Nitrated indenoisoquinolines as topoisomerase I inhibitors: a systematic study and optimization. *J Med Chem.* 2007;50(18):4419-4430.