



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
SECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO DE INVESTIGACIÓN**

**SÍNTESIS DE UN ANÁLOGO DE LA L-ORNITINA Y
SU EFECTO SOBRE CÉLULAS NEOPLÁSICAS EN CULTIVO**

**T E S I S
QUE COMO UNO DE LOS REQUISITOS PARA
OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOMEDICINA
Y BIOTECNOLOGÍA MOLECULAR
P R E S E N T A:
BIOL. EXP. INDRA VICTORIA VELAZQUEZ ORTIZ**

**DIRECTORES DE TESIS:
DRA. LORENA I. RODRÍGUEZ PÁEZ
DR. JOSÉ G. TRUJILLO FERRARA**

MEXICO D.F. 2011





INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de México siendo las 13:00 horas del día 27 del mes de junio del 2011 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de la ENCB-IPN para examinar la tesis titulada:

Síntesis de un análogo de la L-ornitina y su efecto sobre células neoplásicas en cultivo

Presentada por la alumna:

Velazquez
Apellido paterno

Ortiz
Apellido materno

Indra Victoria
Nombre(s)

Con registro:

A	0	9	0	3	4	5
---	---	---	---	---	---	---

aspirante de:

Maestría en Ciencias en Biomedicina y Biotecnología Molecular

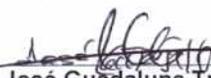
Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA

Directores de tesis



Dr. Lorena Ignacia Rodríguez Páez

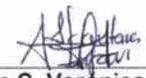


Dr. José Guadalupe Trujillo Ferrara

Dr. José Luis Muñoz Sánchez



Dr. Alfonso Méndez Tenorio



M. en C. Verónica Alcántara Farfán



Dra. Adela Astudillo Vázquez

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES



Dr. Manuel Jesús Piñón López



SE.P.
Escuela Nacional de Ciencias Biológicas
Sección de Estudios



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de México el día 27 del mes de Junio del año 2011, la que **suscribe Indra Victoria Velazquez Ortiz** alumna del **Programa de Maestría en Ciencias en Biomedicina y Biotecnología Molecular** con número de registro A090345, adscrito a la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional, manifiesta que es autora intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de la Dra. Lorena Ignacia Rodríguez Páez y del Dr. José Guadalupe Trujillo Ferrara y cede los derechos del trabajo intitulado **Síntesis de un análogo de la L-ornitina y se efecto sobre células neoplásicas en cultivo** al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección **indravelazquez@gmail.com**. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

Atentamente,

Indra Victoria Velazquez Ortiz

Dra. Lorena Ignacia Rodríguez Páez

Dr. José Guadalupe Trujillo Ferrara



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL



ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**MAESTRÍA EN BIOMEDICINA Y BIOTECNOLOGÍA
MOLECULAR**

**SÍNTESIS DE UN ANÁLOGO DE LA L-ORNITINA
Y SU EFECTO SOBRE CÉLULAS NEOPLÁSICAS EN
CULTIVO**

INDRA VICTORIA VELAZQUEZ ORTIZ

ESTE TRABAJO SE REALIZÓ BAJO LA DIRECCIÓN DE LA DRA. LORENA I. RODRÍGUEZ PÁEZ DEL LABORATORIO DE ENZIMOLOGÍA DEL DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA DE LA ENCB-IPN Y DEL DR. JOSÉ G. TRUJILLO FERRARA DEL LABORATORIO DE BIOQUÍMICA MÉDICA I DEL DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA DE LA ESM-IPN, CON EL APOYO DE LAS BECAS OTORGADAS POR EL CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA (CONACYT), DEL PROGRAMA INSTITUCIONAL DE FORMACIÓN DE INVESTIGADORES DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL (PIFI-IPN) Y DE LA SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO (BECA TESIS).

ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	I
ÍNDICE DE FIGURAS.....	III
RESUMEN.....	IV
ABSTRACT.....	V
I. INTRODUCCIÓN.....	1
I.1 POLIAMINAS	1
I.2 METABOLISMO DE LAS POLIAMINAS	2
I.3 FUNCIONES DE LAS POLIAMINAS	3
I.3.1 UNIÓN AL DNA	4
I.3.2 SÍNTESIS DE DNA Y DE PROTEÍNAS	4
I.3.3 CRECIMIENTO CELULAR	5
I.3.4 APOPTOSIS	5
I.3.5 OTRAS FUNCIONES	7
I.4 LA ORNITINA DESCARBOXILASA (ODC)	8
I.5 INHIBIDORES DE LA ODC	10
I.6 ODC Y CRECIMIENTO NEOPLÁSICO	11
I.7 DFMO Y CÁNCER	14
I.8 MOLÉCULAS CON BORO	14
II. ANTECEDENTES.....	16
IV. HIPOTESIS.....	19
V. OBJETIVO GENERAL.....	20

V.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	20
VI. MATERIALES Y MÉTODOS.....	21
VI.1 REACTIVOS Y MATERIAL BIOLÓGICO.	21
VI.2 SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE LA DFOXBO.	21
VI.3 ESTANDARIZACIÓN DE CULTIVOS DE CÉLULAS HELA (CARCINOMA CERVICAL) UTILIZANDO COMO CONTROL CÉLULAS VERO.	23
VI.3.1 CITOTOXICIDAD DE LA DFOXBO EN CÉLULAS EN CULTIVO.	23
VII. RESULTADOS.....	24
VII.1 SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE LA DFOXBO	24
VII.1.1 ESPECTROSCOPIA DE INFRARROJO DE LA DFOXBO	25
VII.2 CITOTOXICIDAD DE LA DFOXBO EN CÉLULAS EN CULTIVO.	30
VIII. DISCUSIÓN.....	40
IX. CONCLUSIONES.....	45
X. PERSPECTIVAS.....	46
XI. BIBLIOGRAFÍA.....	47

ABREVIATURAS

ODC	Ornitina descarboxilasa
DFOXBO	2,2-difenil-1,3,2-oxazaborolidin-5-ona
DFMO	Difluorometil ornitina
SAM	S-adenosilmetionina
AMD	S-adenosilmetionina descarboxilasa
SRM	Espermidina sintasa
SMS	Espermina sintasa
SSAT	N ¹ -acetil transferasa
PAO	Poliamina oxidasa
SMO	Espermina oxidasa
PPAR γ	Proliferador de peroxisomas
OAZ	Antienzima de la ODC
APC	Supresor tumoral de poliposis adematosa coli
NYAO	N- δ -yodoacetil ornitina
NYAL	N- ϵ -yodoacetil lisina

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Estructura de las poliaminas.	2
Figura 2	Metabolismo de las poliaminas en mamíferos	3
Figura 3	Reacción que cataliza la ornitina descarboxilasa	9
Figura 4	Representación gráfica de los dímeros de la ODC de mamífero	10
Figura 5	Regulación del metabolismo de poliaminas en células normales y en células de cáncer de colon	13
Figura 6	Estructuras químicas de la L-ornitina y su análogo, DFOXBO	18
Figura 7	Síntesis de la DFOXBO	21
Figura 8	Espectro de IR de la DFOXBO	26
Figura 9	Espectro de RMN de ^1H de la DFOXBO	27
Figura 10	Espectro de RMN de ^{13}C de la DFOXBO	28
Figura 11	Espectro de RMN de ^{11}B de la DFOXBO	29
Figura 12	Microfotografías del efecto de la DFOXBO sobre la sobrevivencia de las células Vero y Hela después de 24 h de tratamiento	31
Figura 13	Efecto de la DFOXBO en la sobrevivencia de las células Vero, después de 24 h de tratamiento	32
Figura 14	Efecto de la DFOXBO sobre la sobrevivencia de las células Vero, después de 72 h de tratamiento	33
Figura 15	Microfotografías del efecto de la DFOXBO sobre la sobrevivencia de las células Vero y Hela después de 72 h de tratamiento	34
Figura 16	Efecto de la DFOXBO sobre la sobrevivencia de las células HeLa, después de 24 h de tratamiento	35
Figura 17	Efecto de la DFOXBO sobre la sobrevivencia de las células HeLa, después de 72 h de tratamiento	36
Figura 18	Efecto de la DFOXBO sobre la proliferación de las células Vero	38
Figura 19	Efecto de DFOXBO sobre la proliferación de las células HeLa	39

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Algunos efectos biológicos de las poliaminas	8
Tabla 2. Inhibidores de la ODC y algunas de sus características	12
Tabla 3. Características de la DFOXBO	25
Tabla 4. Valores de EC ₅₀ del efecto citotóxico de la DFOXBO sobre las líneas celulares	36

RESUMEN

Las poliaminas son esenciales para la diferenciación de tejidos, crecimiento celular y procesos de división celular. Por esta razón, la inhibición del metabolismo de las poliaminas (PAA) se ha seleccionado como blanco para la posible quimioterapia del cáncer. En la actualidad se están desarrollando nuevos inhibidores del metabolismo de las PAA que sean más potentes y selectivos, menos tóxicos, que puedan atravesar fácilmente las membranas celulares y cuyo metabolismo y excreción no sea muy acelerado. Se conoce un número considerable de compuestos que son capaces de reducir la actividad de la ornitina descarboxilasa (ODC) en células, sin embargo, la α -difluorometil-ornitina es el único inhibidor de la ODC, que ha sobrevivido los ensayos preclínicos y clínicos preliminares como tratamiento en la quimioterapia del cáncer, aunque uno de sus principales inconvenientes es su toxicidad y su acelerado metabolismo.

En el laboratorio de Enzimología del Departamento de Bioquímica de la ENCB del IPN, se trabaja en el diseño, síntesis y estudio de fármacos antineoplásicos que tengan como base ser inhibidores enzimáticos de la ODC. Por lo que en este estudio se sintetizó y evaluó la 2,2-difenil-1,3,2-oxazaborolidin-5-ona de la L-ornitina (DFOXBO), como un posible agente antineoplásico de células cancerosas en cultivo. La DFOXBO se caracterizó por espectroscopia de infrarrojo y por resonancia magnética nuclear de ^1H , ^{13}C y ^{11}B . Se determinó el efecto de la DFOXBO sobre la sobrevivencia y proliferación de las líneas celulares: células Vero (control no neoplásico) y células HeLa (carcinoma cervical). Los experimentos de citotoxicidad mostraron que la DFOXBO prácticamente no afectó la viabilidad de las células Vero control y sí provocó efectos citotóxicos dependientes de la concentración y del tiempo, en células neoplásicas HeLa, con valor de EC_{50} de $10\ \mu\text{M} > \text{EC}_{50} < 50\ \mu\text{M}$. La putrescina revirtió parcialmente el efecto citotóxico de la DFOXBO, sugiriendo que produjo el efecto citotóxico por inhibición de la ODC. La DFOXBO provocó inhibición de la proliferación celular, dependiente de la concentración, en células neoplásicas HeLa, con un ligero efecto antiproliferativo sobre las células Vero control. De acuerdo a lo anterior, la DFOXBO tiene expectativas para continuar estudiándola y posiblemente, en el futuro, lograr que sea utilizado como agente quimioterapéutico en el tratamiento del cáncer y otras enfermedades proliferativas.

ABSTRACT

Polyamines are essential for tissue differentiation, cell growth and cell division processes. Enzyme inhibition is a strategy used to develop new chemotherapeutic agents. For this reason, inhibition of metabolism of polyamines (PAA) has been selected as a possible target for cancer chemotherapy. Currently, more potent and selective inhibitors of the metabolism of polyamines are being developed, that are less toxic, which can pass through cell membranes and whose metabolism and excretion is not very fast. We know a considerable number of compounds that are capable of reducing ODC activity in cells, however, α -difluoromethyl-ornithine is the only inhibitor of ODC, which has survived preclinical and preliminary clinical trials as treatment in cancer chemotherapy, although one of its main drawbacks is its toxicity and accelerated metabolism.

Enzymology Laboratory from Department of Biochemistry, ENCB-IPN is working on the design, synthesis and study of antineoplastic agents that are ODC enzyme inhibitors. So, in this study it was synthesized and evaluated the 2,2-diphenyl-1,3,2-oxazaborolidine-5-one of the L-ornithine (DFOXBO), as a potential antineoplastic agent on *in vitro* cancer cells. The DFOXBO was characterized by infrared spectroscopy and nuclear magnetic resonance of ^1H , ^{13}C and ^{11}B . It was determined the effect of DFOXBO on the survival and proliferation of cell lines: Vero cells (control non-neoplastic) cells and HeLa cells (cervical carcinoma). Cytotoxicity experiments showed that DFOXBO caused cytotoxic effects in concentration and time dependant manner in HeLa cells, with EC_{50} value of $10\ \mu\text{M} > \text{EC}_{50} < 50\ \mu\text{M}$ and practically did not affect the viability of Vero cells. Putrescine partially reversed the cytotoxic effect of DFOXBO, suggesting that the cytotoxic effect produced it was by inhibition of ODC. Besides, DFOXBO caused inhibition of cell proliferation in a concentration-dependant manner in HeLa cells, with a slight antiproliferative effect on control Vero cells. According to the above, the DFOXBO has expectations to continue studying and possibly in the future, to make it used in the treatment of cancer and other proliferative diseases.

I. INTRODUCCIÓN

I.1 POLIAMINAS

Las poliaminas fueron descubiertas por Antonie van Leeuwenhoek en 1678 al identificar cristales en el semen humano, pero no fue hasta 1924 que Otto Rosenheim determinó la estructura química correcta de la espermidina. El descubrimiento de la putrescina se atribuye a Brieger, en 1885, quien las aisló de tejido animal.

Las poliaminas son un grupo de moléculas nitrogenadas de bajo peso molecular; son cationes orgánicas, dado que sus grupos amino primarios y secundarios están protonados al pH fisiológico; otra característica de ellas, es la presencia de grupos metilo que pueden formar interacciones hidrofóbicas además de las cargas positivas. Esto les permite formar interacciones más fuertes y más específicas que los cationes inorgánicos. También pueden formar puentes de hidrógeno con el agua, lo que permite su disolución en medios acuosos.

Las poliaminas más conocidas son la putrescina (1,4-diamino butano), la espermidina (1,8-diamino-4-azaoctano) y la espermina (1,12-diamino-4,9-diazadodecano) (Figura 1), la espermidina y espermina existen principalmente en soluciones acuosas a un pH de 7.4 donde están totalmente protonadas (Thomas y Thomas, 2001) .

Las poliaminas son constituyentes naturales de las células animales y vegetales, y están ampliamente distribuidas en los sistemas biológicos, aunque las concentraciones relativas de putrescina, espermidina y espermina varían notablemente entre los grupos celulares. En general, los procariotas tienen concentraciones más altas de putrescina que de espermidina y carecen de espermina.

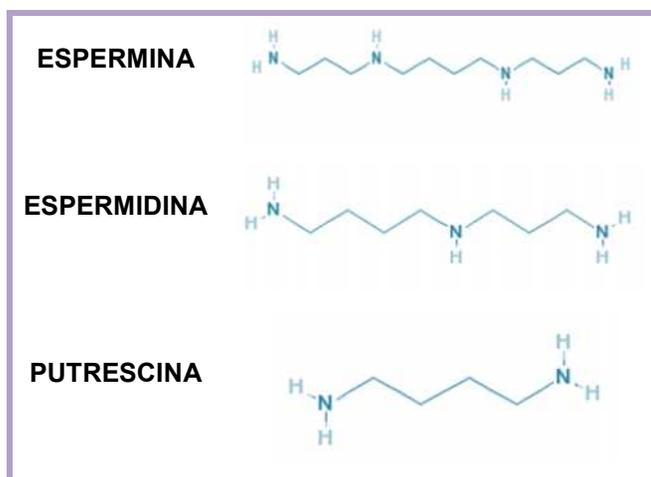


Figura 1. Estructura de las poliaminas.

En algunas bacterias, la putrescina proviene de la descarboxilación de la L-arginina. En mamíferos, la putrescina se sintetiza en el citoplasma como consecuencia de la descarboxilación de la L-ornitina, que es un aminoácido que no forma parte de las proteínas y que se sintetiza en el ciclo de la urea, donde participan tanto enzimas citosólicas como mitocondriales (Gerner y Meyskens, 2004).

I.2 METABOLISMO DE LAS POLIAMINAS

Todas las células de los tejidos de mamíferos tienen la capacidad de sintetizar las poliaminas que necesitan, aunque éstas también pueden provenir de la dieta y de bacterias intestinales, que se transportan hacia el interior de las células por transportadores específicos (Figura 2) (Milovic, 2001).

La L-ornitina necesaria para la biosíntesis de las poliaminas, proviene de la acción de la arginasa, la cual transforma a la L-arginina en L-ornitina, en el ciclo de la urea (Figura 2).

La ornitina descarboxilasa (ODC, EC 4.1.1.17) es una enzima poliaminas, en la cual hay una descarboxilación de la L-ornitina para formar putrescina (Figura 2). La putrescina se transforma en espermidina y para ello se necesita que la S-adenosilmetionina (SAM) se descarboxile (dcSAM) por la S-adenosilmetionina

descarboxilasa (AMD, EC 4.1.1.50). Ésta dona su grupo propilamino, y así la espermidina sintasa (SRM, EC 2.5.1.16) lo utiliza como sustrato para formar a la espermidina. De la misma manera, la espermidina se transforma en espermina por la adición de otro grupo propilamino, esta reacción es catalizada por la espermina sintasa (Figura 2) (SMS, EC 2.5.1.22) (Gerner y Meyskens, 2004).

Las poliaminas también se pueden interconvertir unas en otras por medio de la espermidina/espermina N¹-acetiltransferasa (SSAT, EC 2.3.1.57), que monoacetila a la espermina y espermidina. Estos derivados monoacetilados son sustratos de la poliamina oxidasa (PAO, EC 1.4.3.4), que cataliza sus conversiones de vuelta a putrescina. La espermina oxidasa (SMO, 1.5.3.3) oxida a la espermina no acetilada. Las diaminas y sus derivados monoacetilados también pueden ser exportados por el transportador DAX (exportador de diaminas), y después ser eliminados del organismo por la orina (Gerner y Meyskens, 2004).

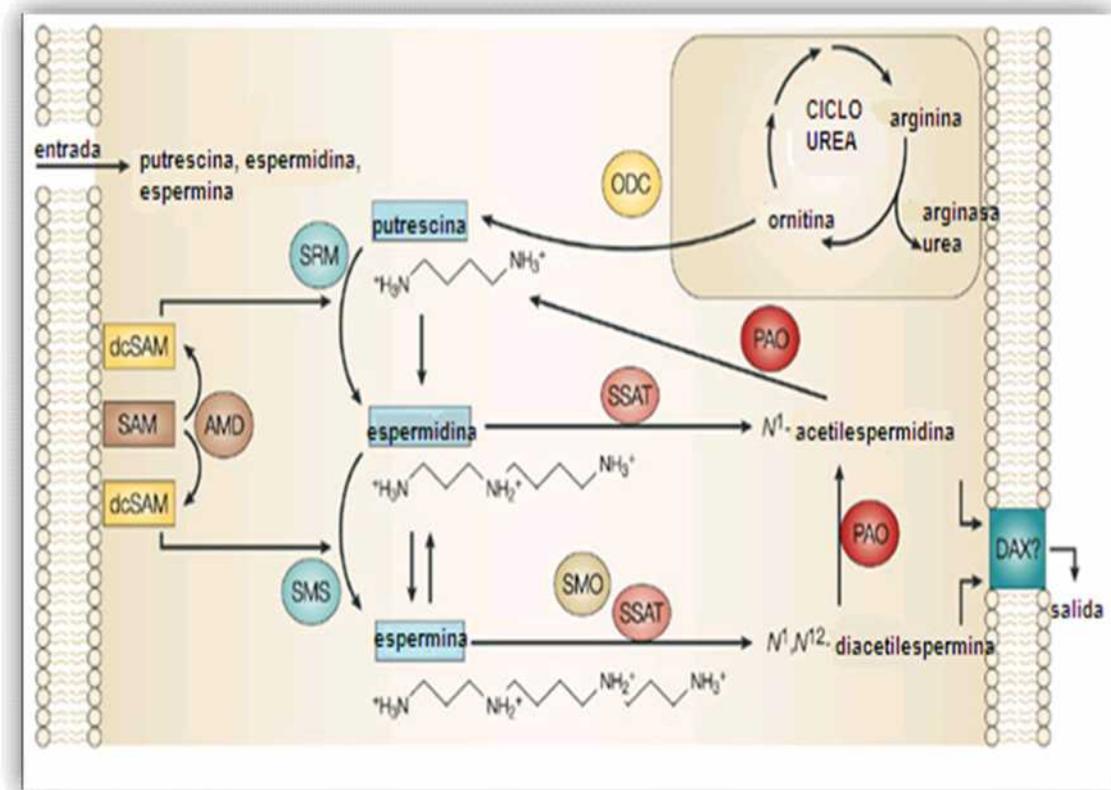


Figura 2. Metabolismo de las poliaminas en mamíferos (Gerner y Meyskens, 2004).

I.3 FUNCIONES DE LAS POLIAMINAS

I.3.1 UNIÓN AL DNA

La característica más importante de las poliaminas es su capacidad para unirse a los ácidos nucleicos, especialmente al DNA, dándole estabilidad a la doble cadena. Las poliaminas neutralizan las cargas de los grupos fosfato del DNA, interactúan con las bases nitrogenadas del ácido nucleico acoplándose dentro de los surcos de la doble hélice por lo que se sugiere que las poliaminas tienen un papel importante en estabilizar la estructura del DNA *in vivo*. Otra consecuencia de la unión de las poliaminas al DNA es la condensación del DNA en la cromatina. Estudios inmunocitoquímicos demostraron que las poliaminas se asocian con cromosomas, aunque es posible que sea para estabilizarlos y no para regular la estructura de la cromatina durante el ciclo celular.

Las poliaminas también inducen cambios conformacionales en el DNA. Su unión promueve la conversión de DNA-B a DNA-Z y a DNA-A, facilitando y regulando la transcripción al permitir las interacciones de los factores de transcripción con regiones específicas en el DNA. Las poliaminas también están involucradas en las vías de señalización que regulan la síntesis de los factores de transcripción (Wallace *et al.*, 2003).

I.3.2 SÍNTESIS DE DNA Y DE PROTEÍNAS

Cuando las células tienen deficiencia de poliaminas, los primeros efectos detectables se observan en la síntesis de DNA y de proteínas. La replicación del DNA se afecta en la presencia de inhibidores de las poliaminas; este efecto se muestra claramente en células en cultivo que son deficientes en la producción de poliaminas. La cromatina de estas células es más sensible a la acción de nucleasas.

En la síntesis de proteínas, el efecto de la deficiencia de poliaminas se observa en el daño a nivel de la formación de polisomas, que puede ser resultado

de un efecto a nivel de las etapas de iniciación y/o alargamiento de la síntesis de las proteínas. Estos efectos pueden explicarse por la capacidad de las poliaminas de unirse e influenciar la estructura secundaria de los RNAs (mRNA, tRNA y rRNA) (Wallace *et al.*, 2003) .

I.3.3 CRECIMIENTO CELULAR

La disminución de las poliaminas conduce a cambios en la expresión de muchos genes relacionados con el crecimiento celular. Sin embargo, los mecanismos moleculares por los cuales este patrón de expresión genética se regula no se conocen completamente.

Desde hace muchos años, se tiene el conocimiento que durante el ciclo celular, hay cambios en los niveles de la ODC y de las poliaminas. Se presenta un incremento de la ODC al inicio de la fase G1, seguido de un incremento en el contenido de poliaminas; también hay un segundo incremento de ODC y poliaminas durante la fase G2 y antes del inicio de la mitosis. Así, las poliaminas al igual que las ciclinas/cdk's muestran cambios a través de las diversas fases del ciclo celular, pero la interacción entre estos dos tipos de moléculas reguladoras todavía está por encontrarse. Una sugerencia es que las poliaminas regulan la degradación de las ciclinas. Se ha informado que la concentración intracelular de poliaminas participan en la regulación del ciclo celular por las proteínas p21, p27 y p53 en los "checkpoint" del ciclo celular, y esto puede, en parte, explicar porque sus concentraciones deben de estar controladas en todo el ciclo celular (Wallace *et al.*, 2003).

I.3.4 APOPTOSIS

La muerte celular programada o apoptosis y el crecimiento celular son dos procesos celulares ligados. Las vías que las regulan se traslapan y una señal que induce proliferación celular en un tipo celular o estado fisiológico, puede en otras células o circunstancias, conducir a muerte apoptótica, por lo que no es sorprendente que las poliaminas, además de participar en el crecimiento celular, están involucradas en la regulación de la apoptosis. Paradójicamente, las poliaminas parece que actúan como agentes promotores, moduladores y protectores en la apoptosis. Desde hace años, se conoce el efecto tóxico de las poliaminas sobre las células, bajo ciertas condiciones. Concentraciones anormalmente altas producen muerte celular. La oxidación de espermidina y espermina por la PAO produce peróxido de hidrógeno y aminoaldehídos que son fuertes inductores de la apoptosis; sin embargo, las poliaminas son capaces de inducir apoptosis sin oxidarse y todavía no está claro cuál de ellos es el mecanismo más importante en las células.

Varios estudios realizados con diferentes sistemas celulares, mostraron la relación directa entre el incremento de la actividad de la ODC y la inducción de la apoptosis (Wallace *et al.*, 2003; Seiler y Raul, 2005). c-Myc induce el incremento en la actividad de la ODC y la apoptosis; realmente, c-Myc es el regulador de la expresión de la ODC y se ha demostrado sin lugar a dudas que c-Myc y la ODC participan en el crecimiento y en la muerte celular. Por otro lado, se ha encontrado una fuerte relación de las poliaminas con las vías de señalización que conducen a la apoptosis. Se ha demostrado que las poliaminas como tal son las responsables de la activación o supresión de los factores pro- y anti- apoptóticos, respectivamente, de las cascadas apoptóticas. Sin embargo, los mecanismos por los que llegan a inducir apoptosis, todavía no se conocen, pero es obvio que los niveles excesivamente altos y bajos de poliaminas interfieren con sus interacciones específicas en las células y afectan sus actividades fisiológicas. Se ha sugerido que la significancia fisiológica de las poliaminas reside en el control del ciclo celular, por lo que la inducción temprana de la ODC que se observa al inicio de la apoptosis, puede estar relacionada a la progresión de la célula a través del ciclo celular hasta un “check point” donde la célula puede dirigirse hacia

apoptosis como resultado de señales de muerte celular (niveles de p53/p21/p27). De manera alternativa, cuando se inhibe la apoptosis o la célula presenta lesiones genéticas, la expresión de la ODC puede llevar a transformación celular o desregulación del crecimiento celular (Seiler y Raul, 2005).

I.3.5 OTRAS FUNCIONES

En la última década, se ha demostrado que las poliaminas funcionan como activadores y/o bloqueadores endógenos de varias clases de canales de cationes. Son capaces de activar, inhibir o bloquear receptores a NMDA y bloquear receptores a AMPA y a kainato. Estos tres tipos de receptores pertenecen a la clase de receptores de canales activados por glutamato. Otras posibles funciones de las poliaminas están relacionadas a la participación de las poliaminas en la regulación de la síntesis del óxido nítrico. Esta regulación puede ser mediada, por lo menos en parte, por la regulación del transporte de L-arginina. También, el óxido nítrico es capaz de afectar la biosíntesis de las poliaminas por inhibir a la ODC (Bauer *et al.*, 2001). Así, la regulación de estos moduladores moleculares de las funciones celulares, pueden estar interconectadas.

Por otra parte, cabe destacar la marcada actividad antioxidante de las poliaminas, protegiendo a los ácidos nucleicos y a los ácidos grasos poliinsaturados del estrés oxidativo. Esta actividad antioxidante no se encuentra confinada a un medio lipófilo (como la vitamina E) ni a uno acuoso (como la vitamina C), ya que son sustancias que se disuelven en ambos medios. En este sentido, las poliaminas serían únicas entre los antioxidantes (Salas, 2000) .

De acuerdo a todo lo anterior, las poliaminas tienen una gran variedad de efectos, algunos de ellos se resumen en la Tabla 1.

Tabla 1. **Algunos efectos biológicos de las poliaminas(Rodríguez-Páez 1987).**

1) Poliaminas como factores de crecimiento	a) En microorganismos b) En células de mamíferos
2) Estabilización de membranas biológicas	
3) Asociación con ácidos nucleicos	a) Estabilización de DNA contra la desnaturalización b) Asociación con tRNA c) Estabilización de la forma súper enrollada del DNA d) Superenrollamiento del DNA en bacteriófagos e) Estimulación de la síntesis del DNA f) Estimulación de la síntesis del RNA g) Modificación de la actividad de ribonucleasas h) Estabilización del DNA sintetizado de novo i) Asociación con la cromatina altamente condensada <i>in vivo</i>
4) Efectos de la síntesis de proteínas	a) Unión de moléculas de tRNA a ribosomas b) Estimulación de la metilación del tRNA c) Asociación con ribosomas d) Biogénesis de partículas ribosomales e) Fidelidad de la traducción f) Iniciación de la traducción g) Estimulación de la tRNA nucleotidil transferasa
5) Efectos en varias reacciones metabólicas	a) Estimulación de las nucleótido cinasas b) Modificación de las actividades de proteincinasas c) Aumento de ADP-ribocilaciones de proteínas nucleares d) Activación de la fosforilasa b e) Estimulación de la liposis f) Activación de la colina cinasa g) Estimulación del metabolismo del estradiol en microsomas de hígado
6) Efectos farmacológicos en animales íntegros	a) Efectos nefrotóxicos b) Efectos hipotérmicos y sedativos

I.4 La ornitina descarboxilasa (ODC)

La ODC cataliza la primera reacción en la síntesis de poliaminas, que es la formación de putrescina (Figura 3). Es una enzima dependiente de fosfato de piridoxal. La estructura de la ODC eucariótica es la de una descarboxilasa del grupo IV, estructuralmente homóloga a la bacteriana y en plantas a la arginina descarboxilasa (Kern *et al.*, 1999).

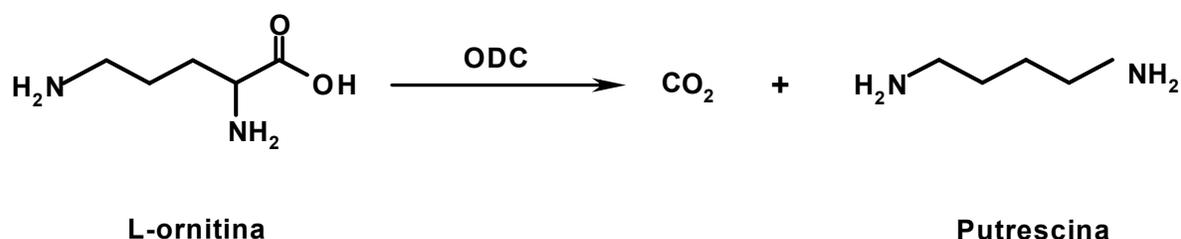


Figura 3. **Reacción que cataliza la ornitina descarboxilasa.**

La ODC es una enzima con una vida media de 10-30 min, es citoplasmática, aunque también se puede encontrar en el núcleo. Es homodimérica, de aproximadamente 50000 daltones de peso molecular por subunidad, requiere de grupos tiólicos para la conservación de su actividad y tiene una *pI* de 4.1 y un pH óptimo de 6.8-7.5. La *K_m* es de 0.2 mM para la ornitina y de 0.25 μM para el fosfato de piridoxal (Ono *et al.*, 1972).

La ODC eucariótica es altamente específica para la L-ornitina, y con una actividad muy débil hacia la L-lisina y una actividad incluso más baja para la L-arginina.

La alta velocidad de recambio de la ODC intracelular, que puede ser tan corta como 10 min, puede explicarse, en parte, por la presencia de dos regiones PEST (secuencias de aminoácidos ricas en prolina, glutamato, serina y treonina). Estructuralmente presenta un dominio de NH₂-terminal formando un β/α-barril que se une al cofactor, y un dominio del COOH-terminal, que tiene una estructura de hoja β. Los sitios activos del dímero se forman en la interfase entre el dominio de NH₂-terminal de una subunidad y el dominio del COOH-terminal de la otra (Figura 4). Una rara propiedad de la ODC es que la asociación entre las 2 subunidades es débil, dado que los monómeros encuentran el equilibrio con rapidez, aun en condiciones fisiológicas (Pegg, 2006).

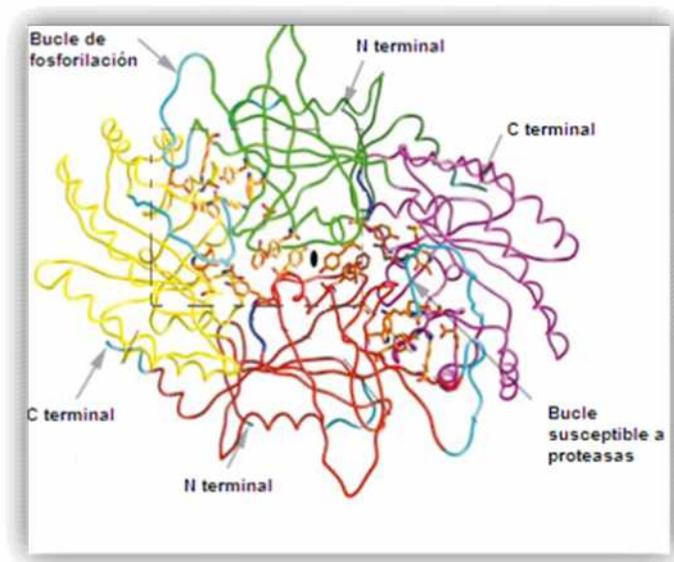


Figura 4. Representación gráfica de los dímeros de la ornitina descarboxilasa de mamífero (Kern *et al.*, 1999).

I.5 INHIBIDORES DE LA ODC

El desarrollo de inhibidores para las poliaminas se ha enfocado en la ODC debido a que es la enzima que regula la biosíntesis de éstas; a partir de la década de los 1970's, estos estudios estuvieron dirigidos a la modificación de la molécula de ornitina, con la idea de obtener análogos estructurales del sustrato capaces de producir su inhibición.

Entre los inhibidores competitivos de la ODC están la α -hidracino ornitina, que inhibe a la ODC de próstata de rata y de *Escherichia coli*. La α -metil-ornitina inhibidor de la ODC en próstata de rata, y bloqueador de la proliferación de células de hepatoma de rata en cultivo (Mamont *et al.*, 1976).

También se sintetizaron inhibidores análogos de la putrescina, porque también, una posible vía para lograr la inhibición de la ODC, es a través de la síntesis de análogos del producto de reacción. Un ejemplo es la trans-1,4-diamino-

2-buteno que es un inhibidor competitivo muy potente. El 1-aminooxi-3-aminopropano es un inhibidor capaz de bloquear la proliferación de células en cultivo de riñón de hámster recién nacido y de células L-1210 (Khomutov *et al.*, 1985; Poulin *et al.*, 1989).

Se han sintetizado también, inhibidores de tipo no competitivo como la canalina, que es un análogo del cofactor, fosfato de piridoxal y también inhibidores suicidas como la α -difluorometil-ornitina (DFMO).

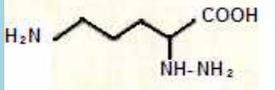
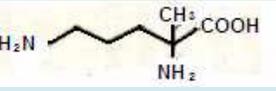
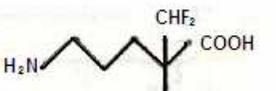
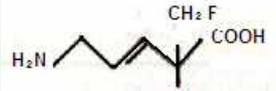
La DFMO es uno de los inhibidores más eficientes de la ODC. La ODC descarboxila a la DFMO, y produce un intermediario electrofílico que reacciona con un centro nucleofílico en el sitio activo de la enzima para formar un enlace covalente, por lo tanto se produce una inactivación irreversible de la enzima. La DFMO como fármaco tiene una gran importancia en la quimioprevención y quimioterapia para varios tumores en humanos (Shantz y Levin, 2007).

En la Tabla 2 se presentan las estructuras y características de inhibición de algunos de los inhibidores de la ODC. No sólo se han diseñado inhibidores para la ODC, también se ha tratado de inhibir a otras enzimas participantes en la síntesis de poliaminas, como por ejemplo, a la enzima SAM descarboxilasa, pero debido a que es una enzima que participa en muchos procesos metabólicos y no sólo en la síntesis de poliaminas, su estudio ha tenido un menor interés. También se han hecho estudios sobre inhibidores de las enzimas espermidina sintasa y espermina sintasa, que se han utilizado para investigaciones de la bioquímica celular.

I.6 ODC Y CRECIMIENTO NEOPLÁSICO

Las poliaminas afectan numerosos procesos en la carcinogénesis. Los incrementos en los niveles de poliaminas están asociados con el incremento de la proliferación celular, una baja en la apoptosis y un incremento en la expresión de genes relacionados con la invasión tumoral y metástasis (Gerner y Meyskens, 2004).

Tabla 2. Inhibidores de la ODC y algunas de sus características.

COMPUESTO	ESTRUCTURA	ANÁLOGO	FUENTE ODC	TIPO DE INHIBICIÓN
α -hidracino ornitina (Stevens, 1980)		Ornitina	Próstata de rata <u>E.coli</u>	Competitiva
α -metil-ornitina(Stevens, 1980)		Ornitina	Próstata de rata	Competitiva
Trans-1,4-diamino-2-buteno (Stevens, 1980)		Putrescina	<u>A. nidulans</u>	Competitiva
Canalina (Rahiala, et al., 1971)		Fosfato de piridoxal	Hígado de rata	No competitiva
α -difluorometil-ornitina (Sjoerdsma y Schechter, 1984)		Ornitina	Hígado de rata	Irreversible
α -monofluorometil-ornitina (Sjoerdsma y Schechter, 1984)		Ornitina	Hígado de rata	Irreversible

Un ejemplo de lo que pasa cuando hay alguna anomalía en la regulación de la ODC se presenta en el cáncer de colon (Figura 5). Normalmente, el supresor tumoral de la poliposis adenomatosa coli (APC) regula la síntesis de poliaminas en células tumorales de colon humano y murino, y en el epitelio intestinal humano. Estudios en cultivos celulares indican que APC suprime la transcripción de MYC, que es un activador de la transcripción de la ODC. El APC regula a la anti enzima de la ODC (OAZ), la cual es una proteína que regula la actividad de la ODC, uniéndosele, lo que la hace blanco para su degradación en el proteosoma. En tejidos y células normales, la mayoría de la proteína KRAS está inactiva como

molécula de señalización. El receptor γ del supresor de tumores activado por el proliferador de peroxisomas (PPAR γ), que activa la transcripción de espermidina/espermina N¹-acetiltransferasa (SSAT), está suprimido por KRAS activa. Por lo tanto, en células y tejidos normales, APC y KRAS reducen la proliferación, incrementan la apoptosis y reducen la neoplasia.

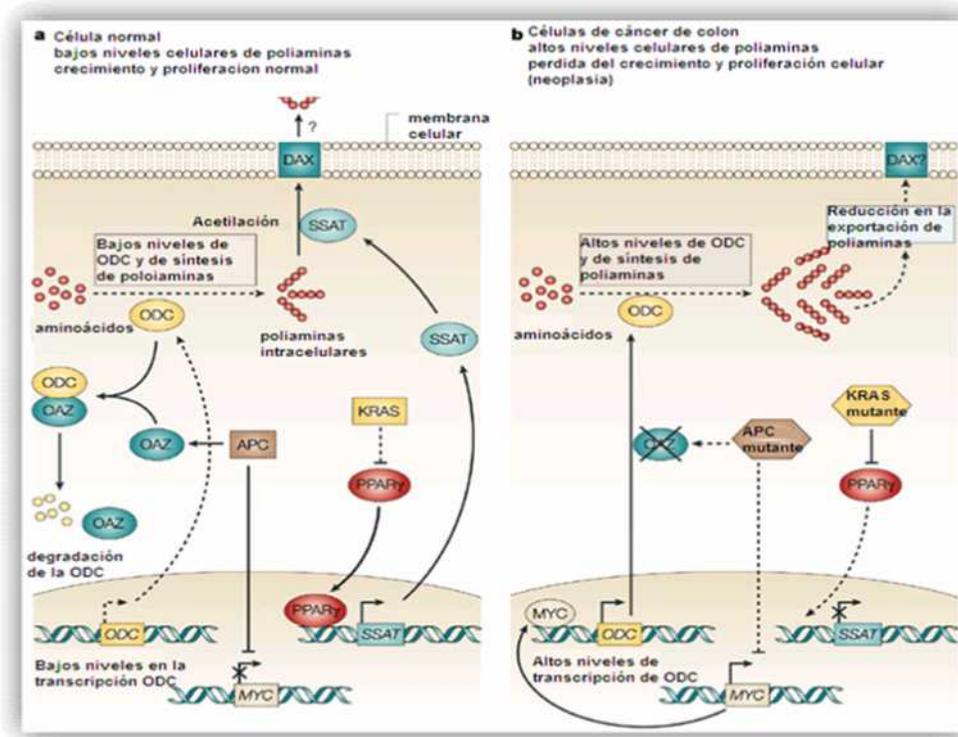


Figura 5. **Regulación del metabolismo de poliaminas en células normales y en células de cáncer de colon (Gerner y Meyskens 2004).** Ver texto para explicación de la figura.

Cuando APC está mutado o no está presente, como ocurre en individuos con poliposis adenomatosa familiar, la expresión de la ODC se incrementa. La pérdida de la función de APC, disminuye la producción de la OAZ, por lo que se incrementa la transcripción y la actividad de la ODC. Mutaciones oncogénicas en KRAS, reducen la hidrólisis de GTP asociado y se activa la cascada de señalización de KRAS, suprimiéndose la degradación de poliaminas, por lo tanto, se incrementan sus niveles intracelulares. En consecuencia, APC y KRAS mutadas promueven el desarrollo de neoplasias por inducir el incremento en la biosíntesis de poliaminas y suprimir su catabolismo (Gerner y Meyskens, 2004).

Así, niveles elevados de poliaminas se asocian con incremento en el crecimiento celular, disminución de la apoptosis, y expresión de algunos genes, de tal manera que estos procesos, en conjunto, controlan el desarrollo celular normal y la reparación de tejidos y cuando se desregulan, se pierde este control y hay la aparición de neoplasias.

I.7 DFMO Y CÁNCER

Como ya se había mencionado antes, la DFMO es un inhibidor suicida de la ODC; este inhibidor detiene el crecimiento celular y disminuye los niveles de putrescina y espermidina en una gran variedad de tipos celulares en experimentos *in vitro*. Sin embargo, los estudios *in vivo* no han resultado como se esperaba, ya que en cánceres humanos, el efecto de la DFMO puede variar y no siempre hay regresión o no progresión del tumor. Por ejemplo, la DFMO no afecta los niveles celulares de espermina, además, su metabolismo en el cuerpo humano es muy rápido, y por el contrario su difusión es impredecible y muy lenta (Raul, 2007).

Otro factor a considerar es la toxicidad de la DFMO ya que altas concentraciones pueden provocar trombocitopenia, leucopenia y anemia, aunque estos síntomas desaparecen al retirar el inhibidor. A pesar de estos inconvenientes, la DFMO ha sido utilizado para evitar el crecimiento neoplásico, ya que combinado con otros fármacos puede disminuir o detener el crecimiento de células cancerosas (Wallace *et al.*, 2003). Esta es una razón por la cual nuestro laboratorio está interesado en trabajar en la búsqueda de nuevos inhibidores de la ODC, que no tengan los efectos indeseables de la DFMO o en su defecto, que estos efectos se presenten en menor medida, y que sean más efectivos para inhibir a la ODC al aplicarse *in vivo*.

I.8 MOLÉCULAS CON BORO

El boro es un elemento ubicuo en la naturaleza. Su concentración promedio varía de ~1 mg/kg en agua a ~100 mg/kg en las rocas (Rezanka y Sigler, 2008). El boro se produce en Turquía y Estados Unidos de Norteamérica y se utiliza en una gran variedad de productos, incluyendo el vidrio, los detergentes, las fibras para reforzar fuselajes de aviones y los materiales superresistentes (Hunter, 2009).

Existen tanto moléculas naturales como sintéticas que contienen boro, que son biológicamente activas: La presencia de boro es esencial para la actividad de varios sistemas enzimáticos en plantas y animales; las diazaborinas son moléculas con actividad antimalárica; compuestos con boro tienen actividad bactericida y fungicida. También existen moléculas con boro que se utilizan con fines quimioterapéuticos contra el cáncer. Velcade® (bortezomib), es un fármaco, α -amido boronato que se usa como un agente antineoplásico, para tratar mieloma múltiple, el cáncer de células plasmáticas (Hunter, 2009). La radioterapia del cáncer a través de moléculas con boro es un recurso terapéutico reciente. El método se llama terapia de captura de neutrones con boro. Esta terapia se basa en una reacción nuclear entre un isótopo estable (no radiactivo) del ^{10}B y neutrones de baja energía que generan partículas alfa directamente en células cancerosas (Gnewuch y Sosnovsky, 2002).

Últimamente, ha habido un gran interés en el boro, debido a sus similitudes, pero también debido a sus diferencias con el átomo de carbono. El boro está inmediatamente a la izquierda del carbono en la tabla periódica y forma compuestos más pequeños, de un tamaño apropiado para interactuar en sitios de unión específicos, como lo hace el carbono. Entre las diferencias más interesantes entre el boro y el carbono está el que el boro forma agrupaciones tipo clatratos, y no cadenas y anillos rígidos como el carbono (Sjoberg *et al.*, 1997; Gnewuch y Sosnovsky, 2002). De tal manera que el boro puede formar estructuras con mayor variabilidad geométrica que el carbono. Por otro lado, las moléculas con boro presentan distribuciones de carga únicas, que les permite formar enlaces no covalentes necesarios para las interacciones transitorias en los

sitios de acoplamiento con las proteínas requeridos en las reacciones bioquímicas. También, las moléculas con boro tienen comportamientos hidrofóbicos únicos que pueden ser aprovechados farmacológicamente (Hunter, 2009).

II. ANTECEDENTES

Una de las líneas de investigación en el laboratorio de Enzimología del Departamento de Bioquímica de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas (ENCB), está asociada al diseño, síntesis y estudio de fármacos antineoplásicos que tengan como base ser inhibidores enzimáticos de la ODC, la enzima que regula la vía biosintética de las poliaminas (Rodríguez-Páez *et al.*, 1997; Rodríguez-Páez *et al.*, 1998; Correa-Basurto *et al.*, 2009). Así, desde hace tiempo se diseñaron y sintetizaron moléculas que son análogos de la L-ornitina, sustrato natural de la ODC, la N- δ -yodoacetil ornitina (NYAO) y la N- ϵ -yodoacetil-L-lisina (NYAL), que fueron inhibidores de la ODC, pero que ya no se continuaron estudiando debido a su toxicidad (Trujillo-Ferrara *et al.*, 1992). Recientemente, se sintetizó y estudió la N- δ -cloroacetil ornitina, otro análogo de la L-ornitina, que también fue inhibidor de la ODC, y menos tóxico que el derivado yodoacetilado (Correa-Basurto *et al.*, 2009).

Las oxazaborolidinas son compuestos que contienen boro, que poseen enlaces B-N. Se pueden formar a partir de una amina y del ácido borónico (Trujillo *et al.*, 1998). Algunos de estos derivados del boro, presentan actividad farmacológica: tienen actividad bactericida (Jabbour *et al.*, 2004), bloquean canales de calcio en plaquetas (Dobrydneva *et al.*, 2006) y presentan efectos sobre la apoptosis (Velasco *et al.*, 2007).

En el laboratorio de Bioquímica de la Escuela Superior de Medicina, se sintetizaron las 2,2-difenil-1,3,2-oxazaborolidin-5-onas de los aminoácidos Gly, Ile, Arg, Leu, Asp, His, Val, Ser, Pro y Orn para estudiar su efecto sobre la apoptosis

(Velasco *et al.*, 2007). El mejor inductor de apoptosis de esta serie fue el derivado de la Gly.

De acuerdo a lo todo lo anterior, y ya que el 2,2-difenil-1,3,2-oxazaborolidin-5-ona de la L-ornitina (DFOXBO) es un análogo de la L-ornitina, en este estudio, se sintetizó y evaluó a este compuesto, como un posible agente antineoplásico de células neoplásicas en cultivo.

III. JUSTIFICACIÓN

Las poliaminas son un requerimiento indispensable para la diferenciación de tejidos, crecimiento celular y procesos de división celular. De hecho, la inhibición de la síntesis de poliaminas, por inhibición de las enzimas que las biosintetizan, es el enfoque lógico de las estrategias para tratar de obtener nuevos agentes con valor quimioterapéutico en estados patológicos de la proliferación celular.

Con el conocimiento de las propiedades de las enzimas que catalizan la síntesis de las poliaminas, ha habido un gran avance en el diseño de inhibidores de la biosíntesis de las poliaminas. Se han obtenido principalmente inhibidores de la ODC ya que es la enzima que regula la vía metabólica y su inhibición podría tener óptimos resultados terapéuticos si se lograran obtener inhibidores más potentes, selectivos y menos tóxicos, que puedan atravesar fácilmente las membranas celulares y cuyo metabolismo y excreción no sea muy acelerado.

Actualmente se están realizando ensayos clínicos en los cuales se examina a compuestos análogos de las poliaminas y del sustrato natural y producto de la ODC, como agentes terapéuticos en cáncer y enfermedades por protozoarios, el más estudiado hasta el momento es el DFMO, ya que ha demostrado ser relativamente no tóxico y altamente selectivo.

A pesar del modesto éxito clínico en la DFMO todos los estudios realizados demuestran que el metabolismo de las poliaminas es un blanco disponible para la obtención de nuevos fármacos contra procesos cancerígenos e infecciones por parásitos.

Por otro lado, es necesario tener un mayor y mejor conocimiento de los principios que regulan la función de las poliaminas y, en este aspecto, los inhibidores de la síntesis de las poliaminas han sido de gran utilidad.

En el presente, los esfuerzos en este campo están concentrados en los siguientes aspectos: 1) desarrollo de mejores inhibidores de las enzimas que participan en la biosíntesis de las poliaminas. 2) Estudios de las combinaciones de fármacos antipoliaminas con otros agentes químicos (generalmente citotóxicos) no relacionados directamente con el metabolismo de las poliaminas. 3) Desarrollo de análogos estructurales de las poliaminas con actividad antitumoral.

En el laboratorio de Enzimología del Departamento de Bioquímica de la ENCB del Instituto Politécnico Nacional (IPN), se diseñan y desarrollan inhibidores enzimáticos con posible actividad antiproliferativa y se han sintetizado y evaluado como inhibidores de la ODC, algunos análogos de la ornitina, el sustrato natural de esta enzima, los cuales inhiben a la ODC y en este trabajo, se realizó la síntesis y la evaluación del posible efecto antineoplásico *in vitro* de la 2,2-difenil-1,3,2-oxazaborolidin-5-ona de la L-ornitina (DFOXBO) (Figura 6).

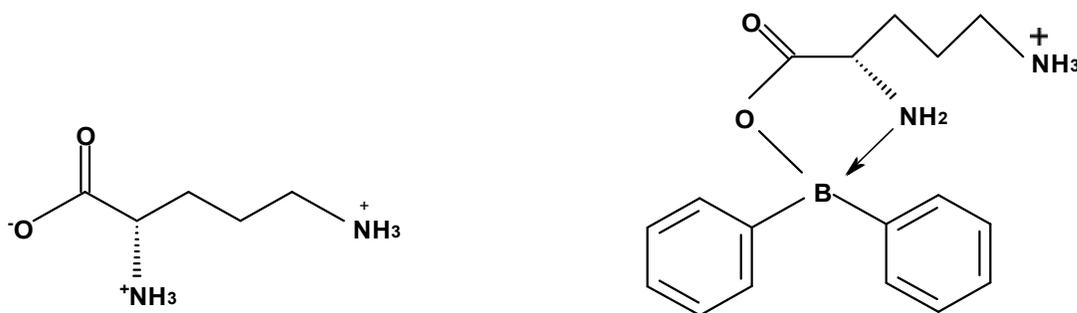


Figura 6. Estructuras químicas de la L-ornitina y su análogo, la 2,2-difenil-1,3,2-oxazaborolidin-5-ona de la L-ornitina

IV. HIPOTESIS

Los análogos de la L-ornitina, N- δ -yodoacetil ornitina y N- δ -cloroacetil ornitina, inhiben a la ODC, por lo tanto es de esperarse que otros análogos de la L-ornitina, también sean inhibidores de la ODC y por ello, disminuir la proliferación de células neoplásicas en cultivo.

V. OBJETIVO GENERAL

Sintetizar y caracterizar el análogo de la L-ornitina, la 2,2-difenil-1,3,2-oxazaborolidin-5-ona de la L-ornitina y determinar su efecto sobre células neoplásicas en cultivo.

V.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Sintetizar y caracterizar a la 2,2-difenil-1,3,2-oxazaborolidin-5-ona de la L-ornitina por IR, ^1H -RMN, ^{13}C -RMN y ^{11}B -RMN.
- Determinar el efecto citotóxico del 2,2-difenil-1,3,2-oxazaborolidin-5-ona de la L-ornitina sobre células neoplásicas en cultivo: células HeLa (carcinoma cervical), utilizando como control células Vero.
- Determinar el efecto antiproliferativo del 2,2-difenil-1,3,2-oxazaborolidin-5-ona de la L-ornitina sobre células neoplásicas en cultivo: células HeLa (carcinoma cervical), utilizando como control células Vero.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

VI.1 Reactivos y material biológico.

Se utilizaron etanol absoluto, L-ornitina, 2-aminoetil difenilborinato, dimetil sulfóxido (DMSO), tetrahidrofurano, azul tripano al 0.1%, adquiridos de Sigma-Aldrich Chemical Company. Regulador de PBS y medio DMEM completo de Invitrogen™. Células HeLa, y Vero obtenidas de ATCC. Todos los demás compuestos que se utilizaron tuvieron una pureza de grado reactivo.

VI.2 Síntesis y caracterización de la 2,2-difenil-1,3,2-oxazaborolidin-5-ona de la L-ornitina (Velasco et al., 2007).

La síntesis de la 2,2-difenil-1,3,2-oxazaborolidin-5-ona de la L-ornitina (DFOXBO) se realizó en una etapa, en una reacción donde el ácido difenil borónico, reaccionó con el grupo α -amino de la L-ornitina formándose la 2,2-difenil-1,3,2-oxazaborolidin-5-ona de la L-ornitina (Figura 7).

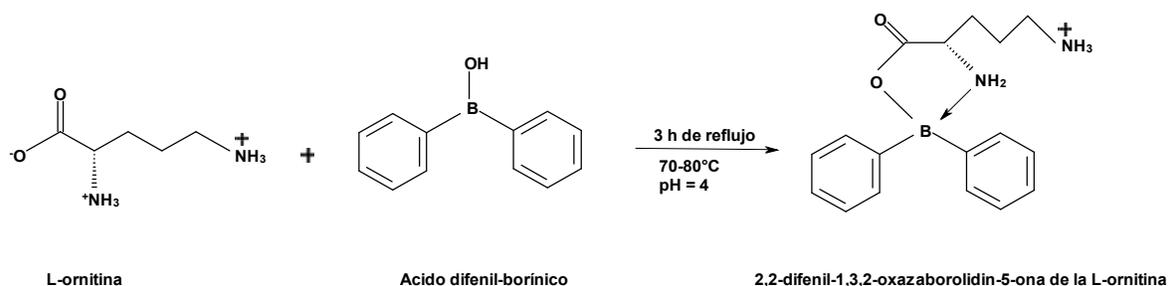


Figura 7. Síntesis de la 2,2-difenil-1,3,2-oxazaborolidin-5-ona de la L-ornitina.

VI.2.1 Síntesis

El ácido difenil borónico, se preparó a partir del 2-aminoetil difenilborinato, por hidrólisis con ácido clorhídrico. Para la obtención de la 2,2-difenil-1,3,2-oxazaborolidin-5-ona de la L-ornitina, se pesaron 2 g del clorhidrato del

aminoácido (0.011 moles), que se disolvieron en la mínima cantidad de agua. Por otro lado, se disolvieron 2.68 g de 2-aminoetildifenil borinato (0.011 moles) en 150 mL de etanol absoluto. Se adicionaron 2 mL de ácido clorhídrico concentrado, o hasta obtener un pH de 4 y se agregó agua destilada hasta que la solución se pusiera blanquesina, inmediatamente después se adicionó la solución de 2-aminoetildifenil borinato, a la solución del aminoácido. Se dejó en reflujo por 3 h, a 70-80°C. Después, el solvente se dejó evaporar a temperatura ambiente hasta obtener el precipitado, el cual se lavó con agua fría y hexano. Se dejó secar a 40°C.

VI.2.2 Caracterización.

Para caracterizar y verificar la estructura molecular del compuesto, se determinó su punto de fusión, y se realizaron las espectroscopías de infrarrojo, de resonancia magnética nuclear de ^1H , ^{13}C , ^{11}B .

VI.2.2.1 Punto de fusión.

Para la determinación del punto de fusión se requirió un equipo Electrothermal Mel-Temp. La muestra se pulverizó y se depositó en un capilar previamente sellado de un extremo, el tubo se colocó en la ranura detrás del ocular y se determinó en punto de fusión. Las determinaciones se repitieron hasta obtener valores fiables.

VI.2.2.2 Espectroscopia de Infrarrojo.

Se mezclaron 100 mg de la muestra con bromuro de potasio seco. Esta mezcla se trituro y se prensó con el fin de formar una pastilla transparente por la que pueda pasar la luz. El bromuro de potasio no absorbe la radiación infrarroja, por lo que las únicas líneas espectrales provendrán de la muestra. Se utilizó el equipo FT-IR Spectrometer 2000 utilizando el programa Spectrum V3.00 para analizar el espectro.

VI.2.2.3 Resonancia Magnética Nuclear de ^1H , ^{13}C Y ^{11}B .

El espectro de resonancia magnética nuclear se efectuó en un espectrofotómetro JEOL 70 para ^1H y 68.7 MHz para ^{13}C , utilizando dimetilsulfoxido deuterado como disolvente y tetrametilsilano como referencia.

VI.3 Estandarización de cultivos de células HeLa (carcinoma cervical) utilizando como control células Vero.

Las células HeLa y Vero se sembraron en botellas de cultivo GIBCO de 50 mL con medio DMEM complementado al 10% con suero fetal de ternera, hasta obtener una confluencia del 100%. Para la propagación de estas líneas celulares, se eliminó el medio de cada botella y la monocapa se lavó 2 veces con 2 mL del regulador de PBS estéril. Se le adicionó 1 mL de tripsina-EDTA al 0.25% y se dejó actuar 2 min a 37 °C. Al despegarse las células, se depositaron en un tubo de plástico de 10 mL que contenía medio DMEM completo. Después, las células se centrifugaron por 5 min a 870 x g a temperatura ambiente, se retiró el sobrenadante y el paquete celular se resuspendió en 2 mL de medio completo. Se sembraron 0.5 o 0.2 mL de células en botellas nuevas de 50 mL o en placas de 24 pozos, que contenían medio DMEM completo, y se incubaron a 37 °C en una incubadora con 5% de CO_2 , hasta llegar al 80% de confluencia para probar el fármaco o al 100% de confluencia para su propagación.

VI.3.1 Citotoxicidad de la 2,2-difenil-1,3,2-oxazaborolidin-5-ona de la L-ornitina en células en cultivo.

Se utilizaron las células HeLa y Vero, a 70-80% de confluencia, cultivadas en cajas de 24 pozos. Se les adicionó el fármaco en diferentes concentraciones, se incubaron 24 y 72 h. Después, las monocapas se lavaron dos veces con PBS estéril, se adicionó azul tripano en una concentración del 0.1%, después de 5 min, se adicionaron 250 μL de PBS estéril. Finalmente se tomaron fotografías de diferentes campos en un microscopio invertido de contraste de fases, estos experimentos se hicieron por duplicado y se repitieron al menos dos veces. Se contaron las células vivas (que excluyeron al azul tripano). La citotoxicidad se midió también en presencia de putrescina para determinar la especificidad del efecto.

VI.3.2 Efecto de la 2,2-difenil-1,3,2-oxazaborolidin-5-ona de la L-ornitina en la proliferación.

Se utilizaron las células HeLa y Vero, a 70-80% de confluencia, cultivadas en cajas de 24 pozos. Se les adicionó el fármaco en diferentes concentraciones y se incubaron 24 h. Después, las monocapas se lavaron dos veces con PBS estéril, se adicionó azul tripano en una concentración del 0.1%, después de 5 min, se adicionaron 250 µL de PBS estéril. Finalmente se tomaron fotografías de diferentes campos en un microscopio invertido de contraste de fases.

Para obtener el efecto del compuesto sobre la proliferación celular se utilizó la siguiente fórmula:

$$P = (N/N_0) \times 100$$

Donde: **P** es proliferación
N es el promedio del número total de células a cualquier concentración del compuesto
N₀ es el promedio del número total de células control

Los experimentos se realizaron también en presencia de putrescina para determinar la especificidad del efecto.

VI.4 Evaluación estadística.

Todas las pruebas estadísticas se realizaron con el programa Sigma Stat[®]. Los datos se trataron por un análisis de varianza de una cola (ANOVA). La significancia de las medias se determinó por el método de comparación múltiple de Holm-Sidak. También se usó la prueba de t de Student. Se muestra el valor aceptado de p (probabilidad) es <0.05. Los resultados se presentan como la media ± error estándar de la media.

VII. RESULTADOS

VII.1 Síntesis y caracterización de la 2,2-difenil-1,3,2-oxazaborolidin-5-ona de la L-ornitina

Se obtuvo un polvo amorfo blanquecino, con un rendimiento del 40% y un punto de fusión de 215°C. En la tabla 3 se muestran algunas características físicas del DFOXBO.

Tabla 3. Características de la DFOXBO.		
<i>Imagen del compuesto</i>		
<i>Punto de fusión</i>	2-aminoetil difenilborinato 190°C	215° C
	L-ornitina 250°C	

VII.1.1 Espectroscopía de Infrarrojo de la 2,2-difenil-1,3,2-oxazaborolidin-5-ona de la L-ornitina.

Se obtuvo el espectro de infrarrojo de la DFOXBO (Figura 8). La banda que se observa a 3549 cm^{-1} corresponde al grupo amino, la banda característica para el enlace carbono hidrógeno corresponde a 3070 cm^{-1} , la banda ubicada a 3272 cm^{-1} corresponde al grupo OH del α -carboxilo, la banda característica para el carbono carbonilo del α -carboxilo se encuentra a 1720 cm^{-1} , la banda perteneciente al enlace boro-oxígeno se ubica en 1286 cm^{-1} y las bandas de 742 y 700 cm^{-1} corresponden a la presencia del grupo fenilo.

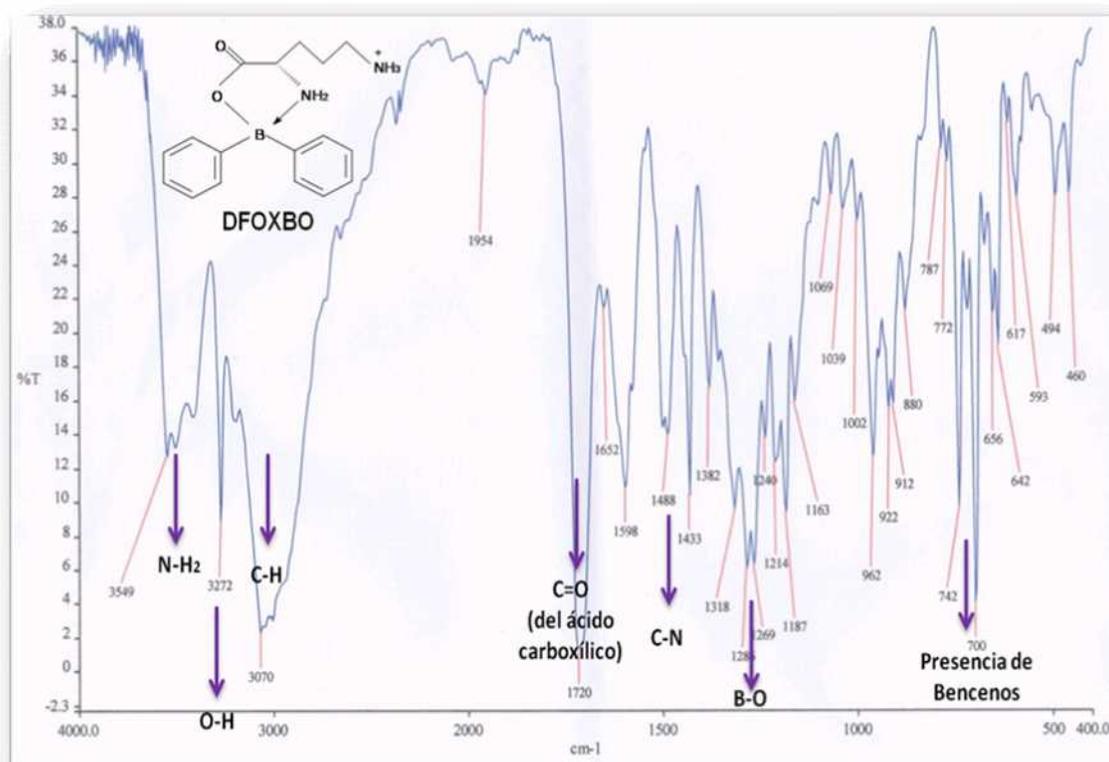


Figura 8. Espectro de IR de la 2,2-difenil-1,3,2-oxazaborolidin-5-ona de la L-ornitina

VII.1.2 Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear de ¹H

Los desplazamientos químicos se dan en ppm respecto al trimetilsilano como referencia interna. En la figura 9 se presenta el espectro correspondiente. La asignación total de las señales fue la siguiente:

¹H-NMR (DMSO-d₆) 1.70-1.89 multiplete (4H, CH₂-CH₂), 2.74 multiplete (2H, CH₂-NH₂), 3.43-3.45 multiplete (1H, CH), 6.81 (triplete, J = 10 Hz, 1.4H, NH₂), 7.11-7.45 (multiplete, 10H, fenilos), 7.45 (triplete, J = 8 Hz, 0.8H, NH₂), 8.11 (singlete, 3H, NH₃).

Los protones del NH₂ reflejan la proporción de anillos cerrados a cadenas abiertas. La señal del NH₂ de 6.806 debe corresponder a la cadena abierta, porque hay más densidad electrónica alrededor del nitrógeno y protege más a los

protones. La señal de 7.45 debe corresponder al nitrógeno enlazado al boro, ya que parte de sus electrones ahora están sobre el boro y los protones quedan desprotegidos. Cuando se agrega D₂O deben desaparecer las señales (o hacerse más pequeñas) de los protones ácidos (enlazados a oxígenos o nitrógenos principalmente) y se observa que las señales de 8.11, 7.45 y 6.81 se hacen muy pequeñas, lo que afirma que corresponden a señales de protones enlazados a nitrógenos. La señal de 2.48 es del DMSO-d₆.

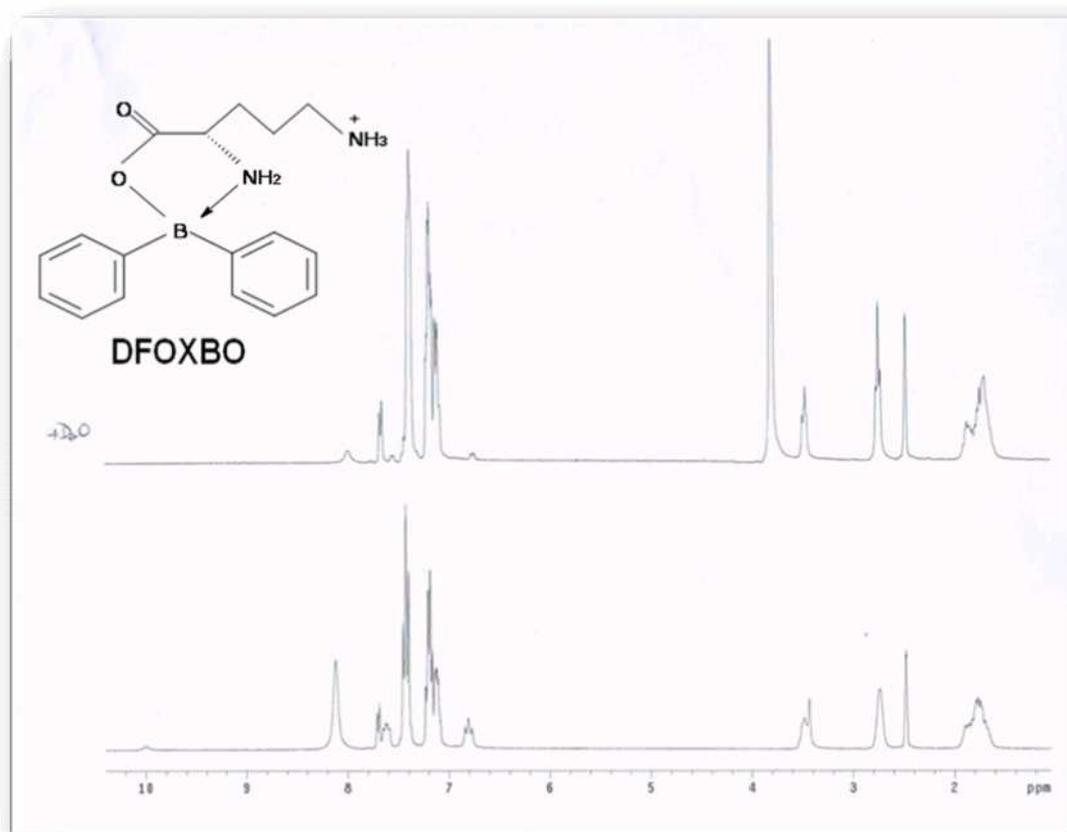


Figura 9. Espectro de RMN de ¹H de la DFOXBO.

VII.1.3 Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear de ^{13}C

Los desplazamientos químicos se dan en ppm respecto al trimetilsilano como referencia interna. En la figura 10 se presenta el espectro correspondiente. La asignación total de las señales fue la siguiente:

^{13}C -NMR (DMSO- d_6) 23.48, 26.49, 37.95, 54.33, 125.801, 125.845, 126.904, 127.404, 130.066, 130.89, 131.097, 134.449, 147.4, 147.8, 173.96

Las dos señales de 23.48 y 26.49 ppm corresponden al CH₂-CH₂ de la ornitina, la señal cercana a 40 ppm corresponden al CH₂-NH₃, el multiplete que le sigue es del DMSO- d_6 , la señal de 54.33 ppm corresponden a CH-NH₂; la señal en 173.96 ppm es del carbonilo; las señales pequeñas entre 147.8 y 147.4 ppm son las de los carbonos enlazados al boro y las demás señales entre 125-135 ppm corresponden a los demás carbonos de los fenilos.

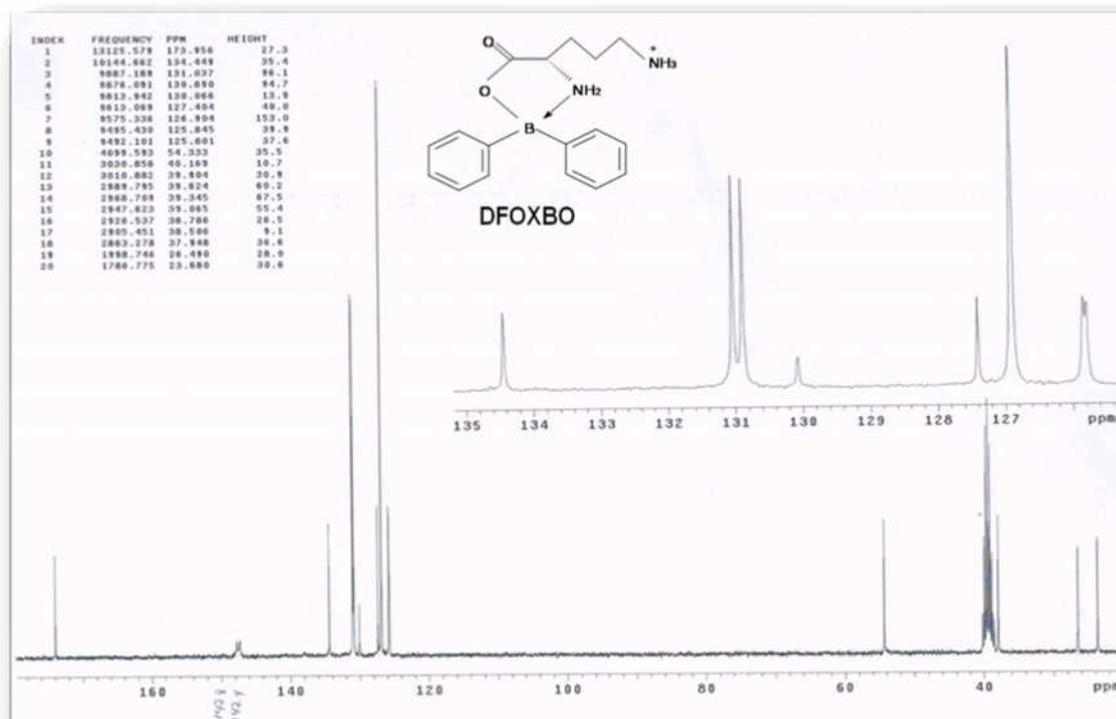


Figura 10. Espectro de RMN de ^{13}C de la DFOXBO.

Figura 10. Espectro de RMN de ^{13}C de la DFOXBO.

VII.1.4 Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear de ^{11}B

Los desplazamientos químicos se dan en ppm respecto al BF_3OEt_2 como referencia interna. En la figura 11 se presenta el espectro correspondiente. La asignación de la señal fue a 4.69 ppm, lo que correspondería a la interacción del boro con el oxígeno y el nitrógeno.

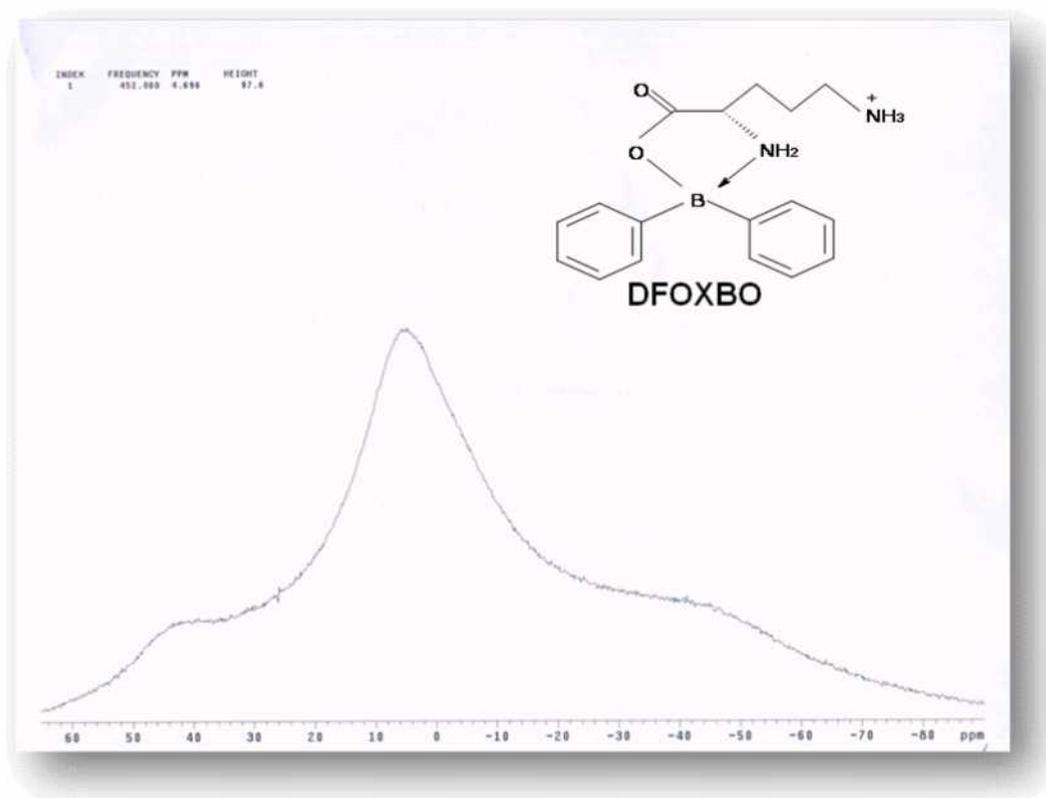


Figura 11. Espectro de RMN de ^{11}B de la DFOXBO.

VII.2 Citotoxicidad de la 2,2-difenil-1,3,2-oxazaborolidin-5-ona de la L-ornitina en células en cultivo.

Se determinó el efecto de la DFOXBO sobre la sobrevivencia de dos líneas celulares: células Vero, usadas como células control no neoplásicas, y células HeLa, de carcinoma cervical. Las células se expusieron a diferentes concentraciones de la DFOXBO durante 24 y 72 h. Se utilizó DMSO para disolver el compuesto; la concentración final en el cultivo celular fue del 1 %. Además, se trató de observar el efecto de la recuperación de la viabilidad celular en presencia de putrescina (10 μ M), ya que si la DFOXBO (por ser análogo de la L-ornitina, sustrato de la ODC) tiene efecto citotóxico, pudiera ser por inhibir específicamente a la ODC, entonces, al adicionar putrescina, que es producto de la reacción que cataliza la ODC, no se observará el efecto citotóxico de la DFOXBO, o éste disminuirá.

VII.2.1 Determinación de la citotoxicidad de la 2,2-difenil-1,3,2-oxazaborolidin-5-ona de la L-ornitina después de tratar las células Vero por 24 h en ausencia y en presencia de putrescina.

En la figura 12, se muestran fotografías representativas de los cultivos de estas células a diferentes concentraciones de DFOXBO. Puede observarse que el DMSO al 1 %, no afectó la viabilidad celular. En la figura 13 se muestra gráficamente el efecto de la DFOXBO sobre las células Vero usadas como control en este estudio. Los resultados muestran un alto porcentaje de sobrevivencia, similar en todas las concentraciones ensayadas, aún a la concentración más alta ensayada, 100 μ M. Se muestra también, que la presencia de putrescina revierte el ligero efecto citotóxico de la DFOXBO. Sin embargo, a la concentración más elevada, no se observa esta disminución de la citotoxicidad.

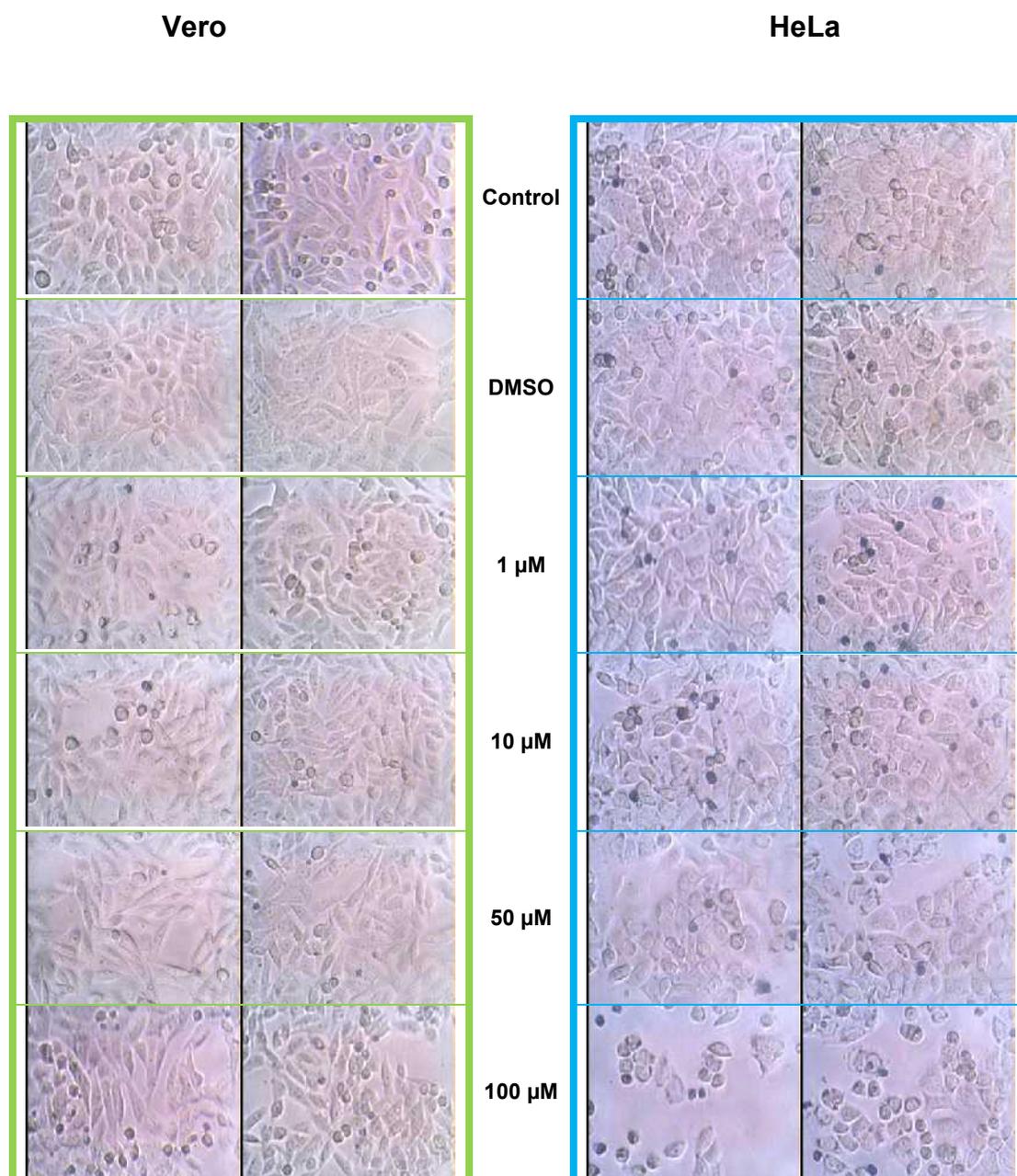


Figura 12. **Microfotografías del efecto de la DFOXBO sobre la sobrevivencia de las células Vero y Hela después de 24 h de tratamiento.** Se muestran fotografías de campos microscópicos obtenidos al azar, en ausencia y presencia de putrescina, a diferentes concentraciones del compuesto.

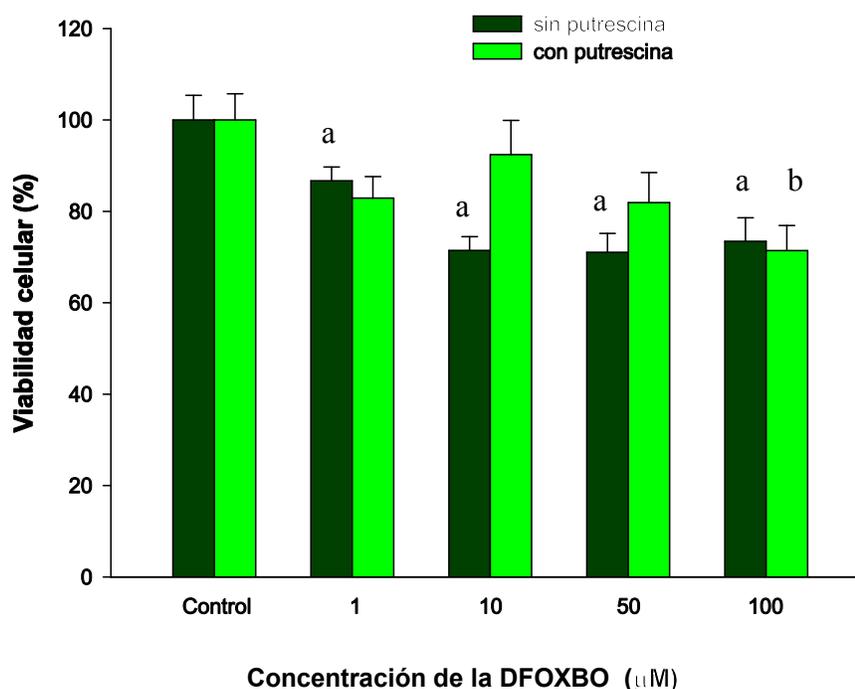


Figura 13. **Efecto de la 2,2-difenil-1,3,2-oxazaborolidin-5-ona de la L-ornitina en la sobrevivencia de las células Vero, después de 24 h de tratamiento.** ^a $p < 0.001$ con respecto al control sin putrescina. ^b $p < 0.002$ con respecto al control con putrescina.

VII.2.2 Determinación de la citotoxicidad de la 2,2-difenil-1,3,2-oxazaborolidin-5-ona de la L-ornitina después de tratar las células Vero por 72 h en ausencia y en presencia de putrescina.

En la figura 14 se muestra el efecto de la DFOXBO sobre las células Vero, después de 72 h de tratamiento. Se puede observar que después de este tiempo, el DMSO al 1 %, no afectó la viabilidad celular. Los resultados muestran, al igual que a las 24 h de tratamiento, hay un alto porcentaje de sobrevivencia, similar en todas las concentraciones ensayadas. La presencia de putrescina disminuyó ligeramente la viabilidad a las células Vero a concentraciones bajas, sin modificarla a concentraciones altas. En la figura 15, se muestran fotografías representativas de los cultivos de estas células a diferentes concentraciones de DFOXBO.

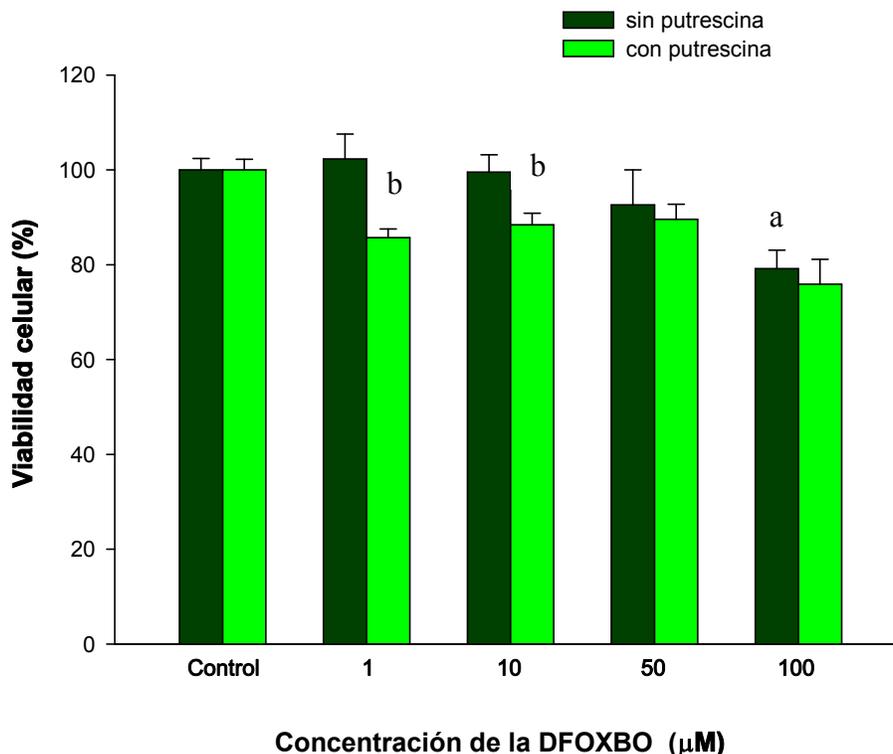


Figura 14. Efecto de la 2,2-difenil-1,3,2-oxazaborolidin-5-ona de la L-ornitina sobre la sobrevivencia de las células Vero, después de 72 h de tratamiento. ^a $p < 0.005$ con respecto al control sin putrescina. ^b $p < 0.005$ con respecto al control con putrescina.

VII.2.3 Determinación de la citotoxicidad de la 2,2-difenil-1,3,2-oxazaborolidin-5-ona de la L-ornitina después de tratar las células HeLa por 24 h en ausencia y en presencia de putrescina.

En la figura 12, se muestran fotografías representativas de los cultivos de estas células a diferentes concentraciones de DFOXBO. Se puede observar que después de 24 h, el DMSO al 1 %, no afectó la viabilidad de las células HeLa. En la figura 16 se muestra gráficamente el efecto de la DFOXBO sobre las células HeLa expuestas durante 24 h. En ausencia de putrescina, la DFOXBO produjo efecto tóxico sobre estas células, dependiente de la concentración. En presencia de putrescina, se observa incremento significativo en la viabilidad celular, excepto a la concentración mas baja.

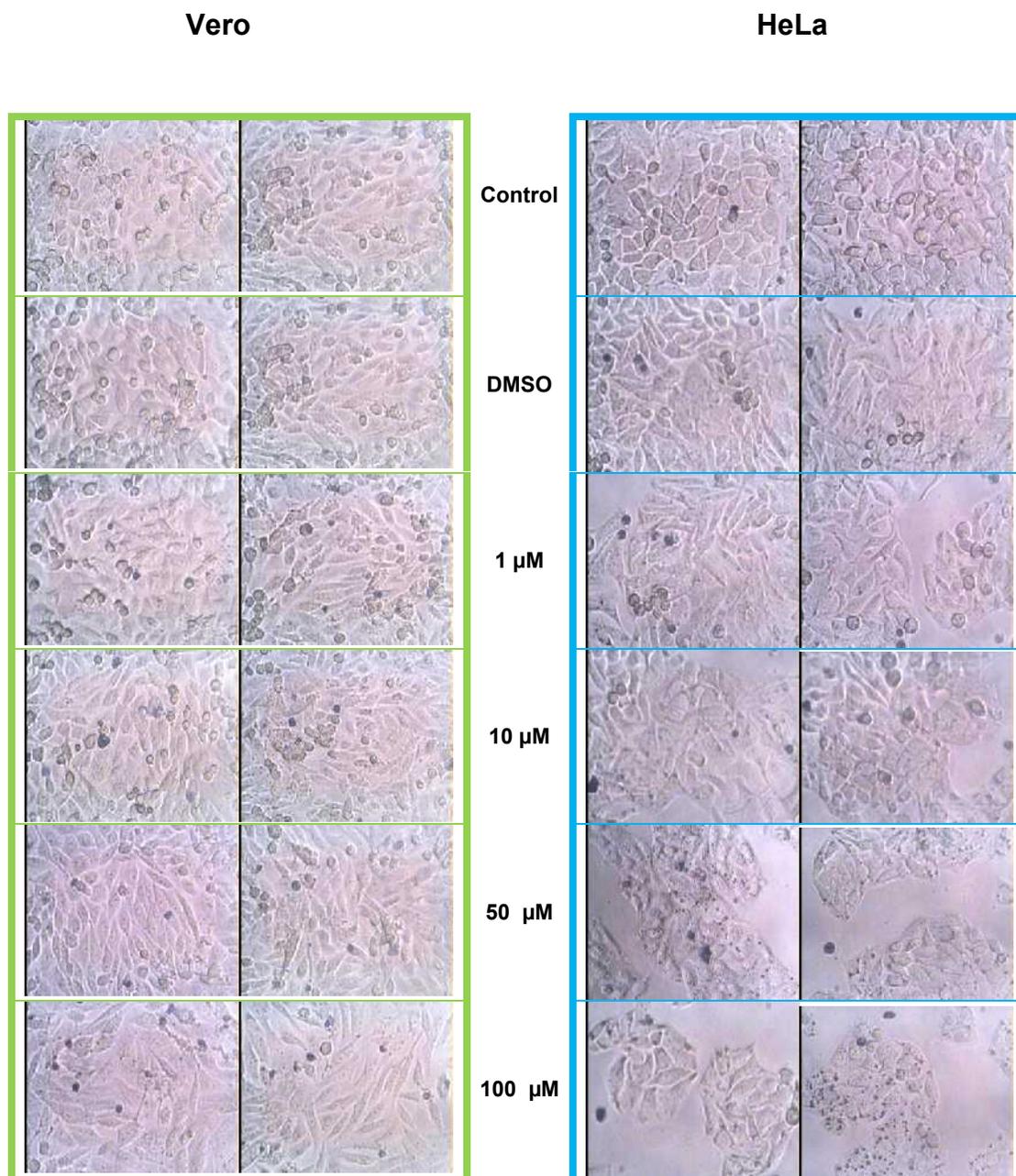


Figura 15. **Microfotografías del efecto de la DFOXBO sobre la sobrevivencia de las células Vero y Hela después de 72 h de tratamiento** Se muestran fotografías de campos microscópicos obtenidos al azar, en ausencia y presencia de putrescina, a diferentes concentraciones del compuesto.

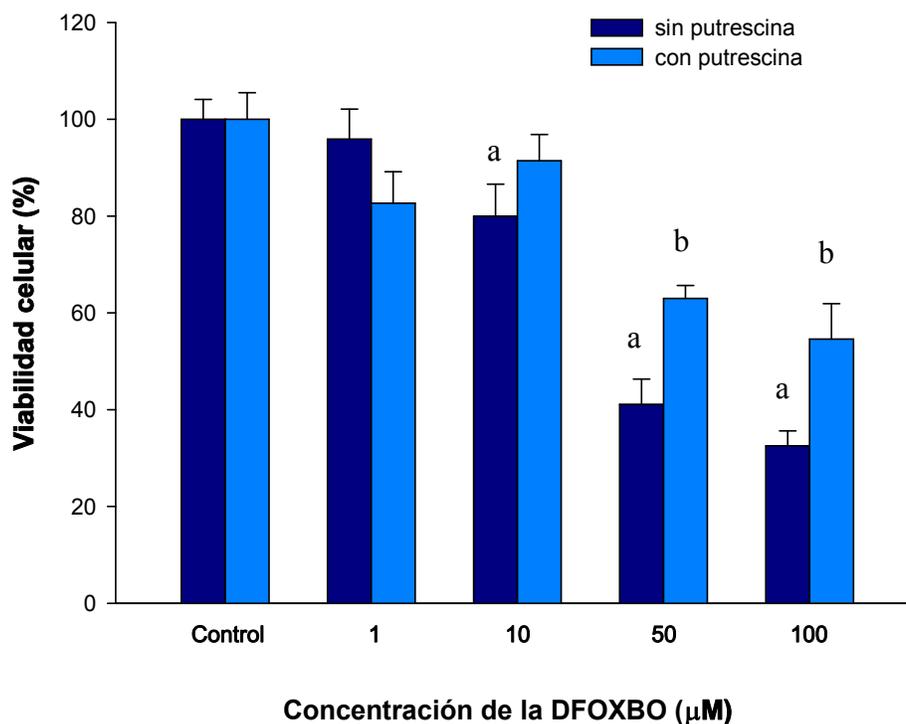


Figura 16. **Efecto de la 2,2-difenil-1,3,2-oxazaborolidin-5-ona de la L-ornitina sobre la sobrevivencia de las células HeLa, después de 24 h de tratamiento.** ^a $p < 0.001$ con respecto al control sin putrescina. ^b $p < 0.001$ con respecto al control con putrescina.

VII.2.4 Determinación de la citotoxicidad de la 2,2-difenil-1,3,2-oxazaborolidin-5-ona de la L-ornitina después de tratar las células HeLa por 72 h en ausencia y en presencia de putrescina.

En la figura 17 se muestra el efecto de la exposición de la DFOXBO sobre las células HeLa durante 72 h. En ausencia de putrescina, la DFOXBO provoca efecto citotóxico, dependiente de la concentración. En presencia de 10 µM de putrescina, se observa reversión del efecto citotóxico. Este resultado es semejante a lo que se presentó con una incubación de 24 h, tanto en la dependencia del efecto citotóxico con la concentración, como con la disminución de la citotoxicidad en presencia de putrescina.

En la figura 15, se muestran fotografías representativas de los cultivos de estas células a diferentes concentraciones de DFOXBO expuestas por 72 h.

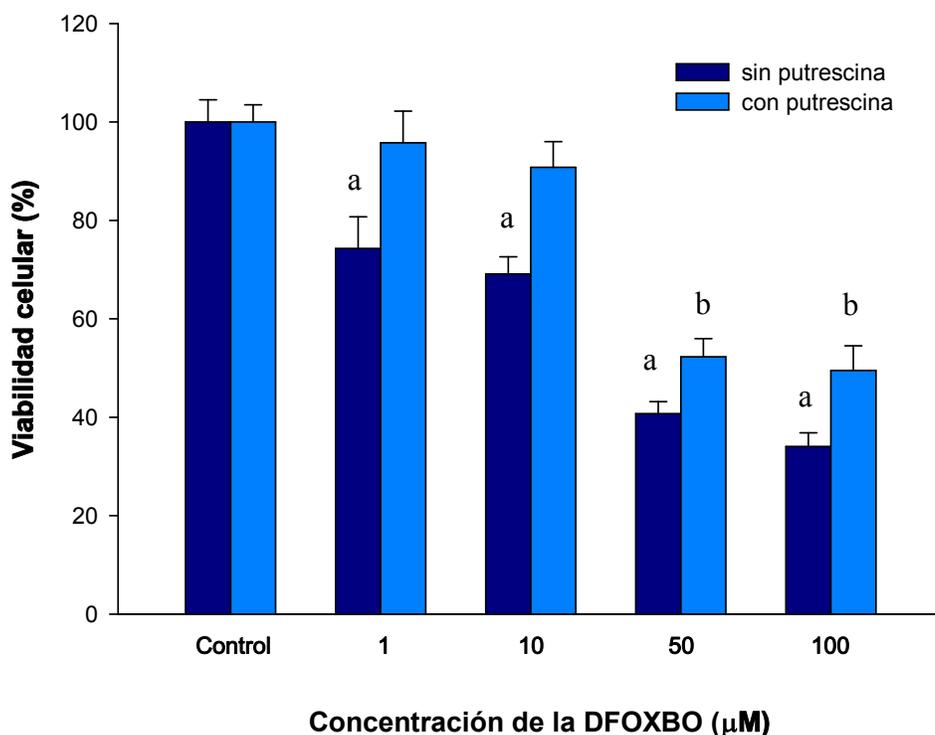


Figura 17. Efecto de la 2,2-difenil-1,3,2-oxazaborolidin-5-ona de la L-ornitina sobre la sobrevivencia de las células HeLa, después de 72 h de tratamiento. ^a $p < 0.001$ con respecto al control sin putrescina. ^b $p < 0.001$ con respecto al control con putrescina.

En la Tabla 4 se presenta un resumen de la efectividad de la DFOXBO sobre la viabilidad de los dos tipos celulares, normal y neoplásico, a través de una aproximación de la concentración efectiva que produce un 50 % en la disminución de la viabilidad celular (EC_{50}).

Tabla 4. Valores de EC_{50} del efecto citotóxico de la 2,2-difenil-1,3,2-oxazaborolidin-5-ona de la L-ornitina sobre las líneas celulares.

Células	EC ₅₀ (µM)	
	Cultivo celular a 24 h	Cultivo celular a 72 h
Vero	> 100	> 100
HeLa	10 > EC ₅₀ < 50	10 > EC ₅₀ < 50

VII.3 Efecto de la 2,2-difenil-1,3,2-oxazaborolidin-5-ona de la L-ornitina sobre la proliferación celular

Se determinó el efecto de la DFOXBO sobre la proliferación celular. También en este caso, se utilizaron las células Vero (control) y las células HeLa (carcinoma cervical), tratándolas a las diferentes concentraciones de la DFOXBO durante 24 h. En la figura 18 se presentan los resultados correspondientes al efecto de la DFOXBO sobre la proliferación de las células Vero.

La DFOXBO disminuyó ligeramente la proliferación de las células Vero que se usaron como control (Figura 18). En presencia de putrescina, ese pequeño efecto antiproliferativo, se revirtió.

En la figura 19 se presentan los resultados del efecto de la DFOXBO sobre la proliferación de las células HeLa. En ausencia de putrescina, se observa un efecto antiproliferativo, dependiente de la concentración. La presencia de putrescina, revirtió el efecto antiproliferativo de la DFOXBO, especialmente a las concentraciones más elevadas.

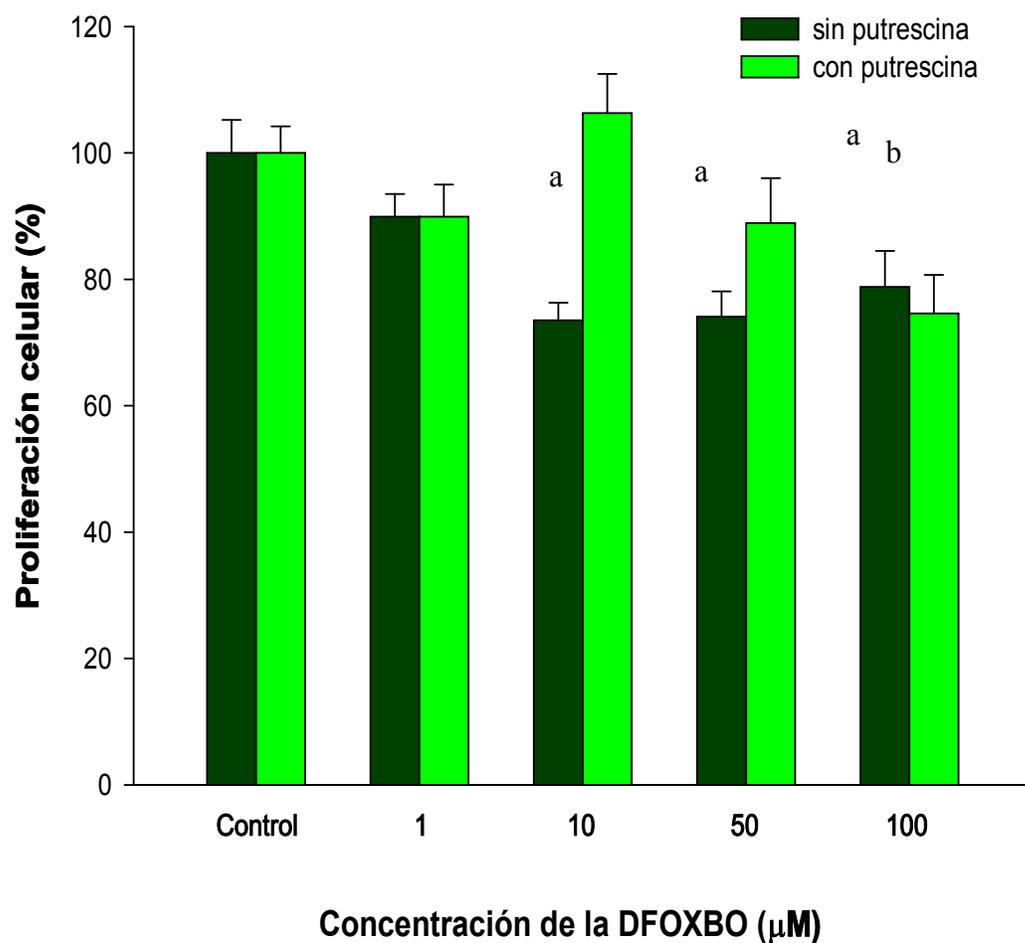


Figura 18. Efecto de la 2,2-difenil-1,3,2-oxazaborolidin-5-ona de la L-ornitina sobre la proliferación de las células Vero. El experimento se realizó después de 24 h de tratamiento. ^a $p < 0.001$ con respecto al control sin putrescina. ^b $p < 0.005$ con respecto al control con putrescina.

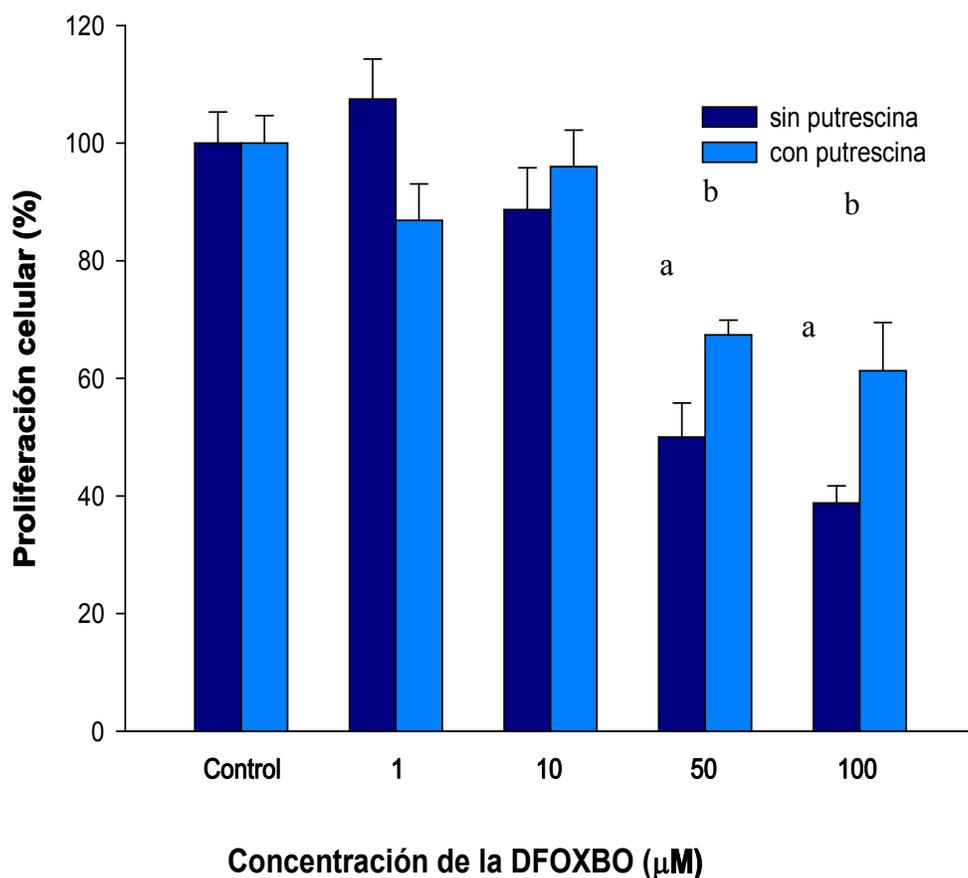


Figura 19. Efecto de la 2,2-difenil-1,3,2-oxazaborolidin-5-ona de la L-ornitina sobre la proliferación de las células HeLa. El experimento se realizó después de 24 h de tratamiento. ^a $p < 0.001$ con respecto al control sin putrescina. ^b $p < 0.001$ con respecto al control con putrescina.

VIII. DISCUSIÓN

Se ha demostrado que un aumento en la síntesis de poliaminas es un hecho obligado, previo a la proliferación celular, ya sea de células en cultivo, tejidos embrionarios, tejidos en regeneración y células tumorales (Marton y Pegg, 1991; Pegg *et al.*, 1998). Se considera que los inhibidores de la biosíntesis de las poliaminas podrían servir no sólo para dilucidar el mecanismo de acción de las poliaminas en la regulación del crecimiento y proliferación celular, sino que además pueden tener aplicación como posibles agentes quimioterapéuticos en la disminución del crecimiento de células caracterizadas por una rápida proliferación celular, como sucede en las enfermedades parasitarias y en el desarrollo de neoplasias. Con este propósito se ha tratado de inhibir, en particular, a la ODC porque esta enzima participa en la reacción limitante de la biosíntesis de las poliaminas, y la inhibición podría conducir a la disminución de los niveles no sólo de putrescina, sino también de espermidina y espermina, dando como resultado inhibición del crecimiento y de la proliferación celular.

La α -difluorometil ornitina (DFMO), inhibidor irreversible de la ODC (Metcalf *et al.*, 1978, Meyskens y Gerner 1999), es el inhibidor de la ODC más estudiado; es un inhibidor suicida que también es capaz de inhibir el crecimiento de células tumorales *in vitro* (células en cultivo) (Mamont *et al.*, 1976) e *in vivo* (modelos animales y humanos) (Pegg *et al.*, 1998; Meyskens y Gerner 1999). En estudios recientes, se ha encontrado que la DFMO inhibe el crecimiento de *Helicobacter pylori*, aparentemente por un mecanismo independiente del metabolismo de las poliaminas (Barry *et al.*, 2011).

En la actualidad, el uso de inhibidores de la ODC en ensayos clínicos, se reduce casi exclusivamente a la DFMO (Meyskens y Gerner 1999; Wallace *et al.*, 2003), a pesar de haberse sintetizado decenas de compuestos que inhiben a la ODC (Stevens, 1980; Rodríguez-Páez *et al.*, 1991).

El hecho de que existan inhibidores de la ODC muy potentes *in vitro* no asegura que lo sean *in vivo*, ya que entran en juego otros factores como la incorporación a las células, la toxicidad del inhibidor y el metabolismo del mismo, por lo que el uso de éstos como agentes quimioterapéuticos, no ha tenido todo el éxito esperado. Por ejemplo, la DFMO se elimina *in vivo* muy rápidamente, esta característica junto con la vida media tan corta de la ODC, hacen que el inhibidor deba administrarse *in vivo* en grandes cantidades para lograr su efecto, lo cual hace que se incremente su toxicidad (Tracy y Webster, 1996; Meyskens y Gerner 1999; Seiler, 2003). Otro problema que se presenta *in vivo* es la incorporación de los inhibidores al interior de las células. Muchos de ellos no pueden penetrar la membrana celular y por lo tanto tienen un uso muy limitado, como las isoornitinas que son inhibidores competitivos de la ODC pero no se incorporan a células de hepatoma de rata. También puede suceder que el inhibidor no se incorpore a un determinado tipo de célula pero en otro sí, tal y como sucede con la α -monofluoro metil putrescina, que se incorpora mejor a células de próstata de rata que a las de timo de rata (Danzin *et al.*, 1982). Otro punto que hay que tomar en cuenta son las diferencias en las enzimas debidas a las especies. La DFMO inhibe a la ODC de *Pseudomonas aeruginosa* pero no inhibe a la ODC de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* (Kallio y McCann, 1981).

En general, es muy difícil obtener un inhibidor que sea efectivo en todos los sistemas celulares en que se pruebe sin tener alguno de los inconvenientes ya mencionados.

Por lo anterior, el desarrollo de nuevos inhibidores de la ODC con fines terapéuticos, por modificación de las moléculas sustrato y/o producto con grupos reactivos no introducidos hasta ahora o por una disminución de la polaridad de las moléculas, etc., tiene un campo de acción muy amplio y con perspectivas muy halagadoras (Wallace y Niiranen, 2007).

Así, en este trabajo, se sintetizó un análogo de la ornitina como posible inhibidor de la ODC, por modificación de los grupos funcionales alrededor del carbono alfa de la L-ornitina, el sustrato natural de la ODC (Figura 6). Estudios

anteriores demostraron que el sitio activo de la ODC podía aceptar derivados de la ornitina con grupos tan voluminosos como el N- α -hexil, N- α -octil, N- α -bencil y tetrazolil (Rodríguez-Páez *et al.*, 1987), es decir, estos compuestos interaccionan con la ODC en su sitio activo y la inhiben de manera competitiva. Y desde hace décadas, se tiene conocimiento de que el área de la enzima que acomoda al grupo carboxilo de la L-ornitina, no es sensible a impedimento estérico y que las interacciones hidrofóbicas son importantes para la unión en el sitio activo (Bey *et al.*, 1978).

Por ello, en este trabajo, se decidió sintetizar la difeniloxazaborolidinona de la L-ornitina (DFOXBO), como posible inhibidor de la ODC y ensayar su efecto sobre células neoplásicas en cultivo. Esta molécula presenta modificaciones químicas alrededor del carbono alfa, además de incremento en la lipofilicidad por la introducción de dos grupos aromáticos.

Se sintetizó la DFOXBO en una etapa, lo que hizo que la síntesis se lograra en un corto tiempo y se disminuyeran los posibles productos secundarios que se pudieran formar, lo que a su vez hizo que el rendimiento del producto fuera aceptable y de alta pureza, confirmado por el punto de fusión y la espectroscopia de infrarrojo y de resonancia magnética de ^1H , ^{13}C y ^{11}B . Con los estudios de RMN, también se corroboró la estructura molecular de la DFOXBO.

Es muy importante mencionar que el trabajo inicial comprendía el estudio *in vitro* de inhibición enzimática de la ODC, sin embargo, por no poseer la licencia de operación de material radiactivo -ya que los trámites ante la Comisión Nacional de Seguridad Nuclear y Salvaguardias han sido demasiado largos- no fue posible realizar esta parte del protocolo inicial. Aún así, continuamos con los otros experimentos ya programados.

Los resultados del efecto citotóxico de la DFOXBO sobre la línea celular neoplásica HeLa, mostraron un efecto dependiente de la dosis, después de 24 y 72 h de tratamiento. La presencia de putrescina revirtió el efecto citotóxico. Se esperaba este efecto protector de la putrescina, si la DFOXBO disminuyera la

viabilidad celular por inhibir a la ODC. Este resultado nos sugiere que la DFOXBO puede ser inhibidor de la ODC y que por ello, al adicionar putrescina, que es el producto de reacción de la enzima, se revierte el efecto citotóxico de la DFOXBO.

La DFOXBO no produjo citotoxicidad importante en las células Vero que se utilizaron como control celular no neoplásico, ni a las 24 ni a las 72 h de tratamiento, a todas las concentraciones de DFOXBO ensayadas y, podríamos suponer que éstas células, a pesar de que necesitan a las poliaminas para su proliferación y sobrevivencia, no las necesitan en los niveles que las células neoplásicas lo requieren, sino que es suficiente la cantidad de poliaminas presente en el medio extracelular (Teti *et al.*, 2002; Seiler, 2003).

Por otro lado, ambos tipos celulares reaccionan diferente ante este estímulo tóxico ya que sus proteómicas, metabolómicas y genómicas son diferentes. Dentro de estas diferencias, podemos mencionar los sistemas de detoxificación de moléculas extrañas que tienen ambos y los sistemas de transporte de moléculas hacia el interior y el exterior de las células. Por ejemplo, el sistema de transporte de poliaminas hacia el interior de las células (que es importante para la sobrevivencia celular), es diferente entre los distintos tipos celulares (Byers, Kameji *et al.* 1987; Seiler, Delcros *et al.* 1996; Wallace, Fraser *et al.* 2003; Wallace y Fraser 2004). Es posible que la DFOXBO inhiba el (los) sistema(s) de transporte específico de las PAA de diferente manera, hacia el interior de estos dos tipos celulares o, ya que las PAA se incorporan a las células por diversos sistemas de transporte, puede suceder que estos mecanismos de transporte se afecten también de manera diferente y que ello contribuya a esta diferencia en la muerte celular (Byers *et al.*, 1987; Seiler *et al.*, 1996; Wallace *et al.*, 2003). Además, puede suceder que el sistema de transporte de la DFOXBO hacia el interior de las células sea más eficiente en las células HeLa que en las células Vero, aunque el mecanismo general de incorporación de los fármacos de este tipo, es el de difusión pasiva (Pera *et al.*, 1986).

En cuanto al efecto de la DFOXBO sobre la proliferación celular, los resultados mostraron que la DFOXBO disminuyó la proliferación de las células

HeLa de una manera dependiente de la concentración, sin prácticamente afectar la proliferación de las células Vero control. Es decir, la DFOXBO no tiene efecto antiproliferativo sobre células "normales" y si tiene efecto antiproliferativo sobre células neoplásicas. Sin embargo, habría que realizar un estudio más detallado para afirmar sin lugar a dudas, lo antes mencionado. En general, la DFOXBO se comporta como la DFMO, en cuanto a su capacidad antiproliferativa (Zou *et al.*, 2002). Ellos informaron que la DFMO inhibió la proliferación de células HeLa de una manera dependiente del tiempo y de la concentración y la concentración que inhibió el 50% de la proliferación celular (EC_{50}), fue de 0.8 mM después de 120 h de tratamiento; además, reportaron que otras 6 líneas celulares humanas de carcinomas cervicales crecidas en monocapa (ME180, MS751, C4I, C4II, C33 y Caski), presentaron valores de EC_{50} en el rango de 0.3 a >5 mM, también después de 120 h de tratamiento. De acuerdo a lo anterior, se puede afirmar que la DFOXBO es mejor que la DFMO, sobre células HeLa, ya que la EC_{50} en este estudio está en un intervalo de 10 y 50 μ M. Existen publicaciones que demuestran que la DFMO provoca la detención del ciclo celular en la fase G_1 en células Caco-2, IEC-6, HL-60 y 4T1, pero en células CHO, alarga la fase S (Wallace y Fraser, 2004; Jung y Kim, 2008), lo que abre la expectativa del mecanismo por el que la DFOXBO produce el efecto antiproliferativo. Ya se han iniciado estudios a este respecto, y Velasco *et al.* (2008) han demostrado que la DFOXBO afecta la apoptosis.

Finalmente, la DFOXBO tiene expectativas para continuar estudiándola y posiblemente, en el futuro, lograr que sea utilizado como agente quimiopreventivo y quimioterapéutico en el tratamiento del cáncer y otras enfermedades proliferativas. Por otro lado, es importante haber obtenido una nueva molécula de la que se puede partir para obtener nuevos derivados con la finalidad de mejorar su efecto anticancerígeno y su biodisponibilidad.

IX. CONCLUSIONES

- 1) Se sintetizó la difeniloxazaborolidinona de la L-ornitina en una sola etapa, confirmando la presencia de grupos funcionales en la molécula por espectroscopía de infrarrojo. También se caracterizó por RMN de protón, de ^{13}C y de ^{11}B . Este compuesto presentó un punto de fusión de 215°C .
- 2) Los experimentos de citotoxicidad muestran que la difeniloxazaborolidinona de la L-ornitina, prácticamente no afecta la viabilidad de las células Vero control.
- 3) La difeniloxazaborolidinona de la L-ornitina presentó efectos citotóxicos dependientes de la concentración y del tiempo, en células neoplásicas HeLa, con valores de EC_{50} de $10\ \mu\text{M} > \text{EC}_{50} < 50\ \mu\text{M}$.
- 4) La putrescina revirtió parcialmente el efecto citotóxico de la difeniloxazaborolidinona de la L-ornitina, sugiriendo que el compuesto borado produjo el efecto citotóxico por inhibición de la ornitina descarboxilasa.
- 5) La difeniloxazaborolidinona de la L-ornitina provocó inhibición de la proliferación celular, dependiente de la concentración, en células neoplásicas HeLa, con un ligero efecto antiproliferativo sobre las células Vero control.
- 6) La difeniloxazaborolidinona de la L-ornitina tiene expectativas para continuar estudiándola y posiblemente, en el futuro, lograr que sea utilizado como agente quimiopreventivo y quimioterapéutico en el tratamiento del cáncer y otras enfermedades proliferativas.

X. PERSPECTIVAS

Dentro de las perspectivas del trabajo se encuentran las siguientes:

1. Determinar el posible efecto inhibitor de la difeniloxazaborolidinona de la L-ornitina sobre la ODC.
2. Definir la especificidad y selectividad de la difeniloxazaborolidinona de la L-ornitina sobre el efecto citotóxico y sobre la proliferación celular, para demostrar sin lugar a dudas, que la citotoxicidad es debida a alteración del metabolismo de las poliaminas.
3. Precisar los efectos citotóxicos sobre otras líneas celulares neoplásicas y normales ya que es posible que haya una citotoxicidad diferencial.
4. Evaluar el posible efecto de la difeniloxazaborolidinona de la L-ornitina sobre los sistemas de transporte membranales de poliaminas.
5. Identificar el efecto de la difeniloxazaborolidinona de la L-ornitina sobre el ciclo celular para tratar de dilucidar el mecanismo por el que ejerce el efecto citotóxico.
6. Establecer si el efecto citotóxico de la difeniloxazaborolidinona de la L-ornitina es a través de apoptosis y si lo es, determinar específicamente que procesos apoptóticos participan.
7. Probar los efectos citotóxico y citostático (inhibición de la proliferación celular) en combinación con otros fármacos anticancerígenos.
8. Determinar los efectos citotóxico, citostático y quimiopreventivo *in vivo*.

XI. BIBLIOGRAFÍA

- Barry, D. P., M. Asim, et al. (2011) "Difluoromethylornithine is a novel inhibitor of *Helicobacter pylori* growth, CagA translocation, and interleukin-8 induction." PLoS One 6(2): e17510.
- Bauer, P. M., G. M. Buga, et al. (2001). "Nitric oxide inhibits ornithine decarboxylase via S-nitrosylation of cysteine 360 in the active site of the enzyme." J Biol Chem 276(37): 34458-64.
- Bey, P., Danzin, C., Van Dorsselaer, V., Mamont, P., Jung, M., Tardiff, C. (1978). Analogues of ornithine as inhibitors of ornithine decarboxylase. New deductions concerning the topology of the enzyme's active site. J. Med. Chem. 21: 50-55.
- Byers, T. L., R. Kameji, et al. (1987). "Multiple pathways for uptake of paraquat, methylglyoxal bis(guanylhydrazone), and polyamines." Am J Physiol 252(6 Pt 1): C663-9.
- Correa-Basuto, J., L. Rodríguez-Páez, et al. (2009). "Computational and experimental evaluation of ornithine derivatives as ornithine decarboxylase inhibitors." Med Chem Res 18: 20-30.
- Danzin, C., P. Bey, et al. (1982). "alpha-Monofluoromethyl and alpha-difluoromethyl putrescine as ornithine decarboxylase inhibitors: in vitro and in vivo biochemical properties." Biochem Pharmacol 31(23): 3871-8.
- Dobrydneva Y, Abelt CJ, Dovel B, Thadigiri CM, Williams RL, Blackmore PF. (2006). 2-aminoethoxydiphenyl borate as a prototype drug for a group of structurally related calcium channel blockers in human platelets. Mol Pharmacol. 69(1):247-56.
- Gerner, E. W. and F. L. Meyskens, Jr. (2004). "Polyamines and cancer: old molecules, new understanding." Nat Rev Cancer 4(10): 781-92.
- Gnewuch CT, Sosnovsky G. (1997). Critical appraisals of approaches for predictive designs in anticancer drugs. Cell Mol Life Sci. 59(6):959-1023.

- Hunter P. (2009). Not boring at all. Boron is the new carbon in the quest for novel drug candidates. *EMBO Rep.* 10(2):125-8.
- Jabbour A, Steinberg D, Dembitsky VM, Moussaieff A, Zaks B, Srebnik M. (2004). Synthesis and evaluation of oxazaborolidines for antibacterial activity against *Streptococcus mutans*. *J Med Chem.* 2004 May 6;47(10):2409-10.
- Jung, I. L. and I. G. Kim (2008). "Polyamine as a signaling molecule for controlling an adaptive mutation." *Biochemistry (Mosc)* 73(11): 1228-34.
- Kallio, A. and P. P. McCann (1981). "Difluoromethylornithine irreversibly inactivates ornithine decarboxylase of *Pseudomonas aeruginosa*, but does not inhibit the enzymes of *Escherichia coli*." *Biochem J* 200(1): 69-75.
- Kern, A. D., M. A. Oliveira, et al. (1999). "Structure of mammalian ornithine decarboxylase at 1.6 Å resolution: stereochemical implications of PLP-dependent amino acid decarboxylases." *Structure* 7(5): 567-81.
- Khomutov, R. M., T. Hyvonen, et al. (1985). "1-Aminooxy-3-aminopropane, a new and potent inhibitor of polyamine biosynthesis that inhibits ornithine decarboxylase, adenosylmethionine decarboxylase and spermidine synthase." *Biochem Biophys Res Commun* 130(2): 596-602.
- Mamont, P. S., P. Bohlen, et al. (1976). "Alpha-methyl ornithine, a potent competitive inhibitor of ornithine decarboxylase, blocks proliferation of rat hepatoma cells in culture." *Proc Natl Acad Sci U S A* 73(5): 1626-30.
- Marton, L. J., Pegg, A. E., (1991). Polyamines as target for therapeutic intervention. *Ann. Rev. Pharm. Toxicol.* 35:55-91.
- Meyskens, F. L., Jr. and E. W. Gerner (1999). "Development of difluoromethylornithine (DFMO) as a chemoprevention agent." *Clin Cancer Res* 5(5): 945-51.
- Metcalf, B. W., Bey, P. (1978). Catalytic irreversible inhibition of mammalian ornithine decarboxylase (E.C.4.1.1.7) by substrate and product analogues. *J. Am. Chem. Soc.* 100: 2551-2553.
- Milovic, V. (2001). "Polyamines in the gut lumen: bioavailability and biodistribution." *Eur J Gastroenterol Hepatol* 13(9): 1021-5.

- Ono, M., H. Inoue, et al. (1972). "Studies on ornithine decarboxylase from the liver of thioacetamide-treated rats. Purification and some properties." Biochim Biophys Acta 284(1): 285-97.
- Pegg, A. E. (2006). "Regulation of ornithine decarboxylase." J Biol Chem 281(21): 14529-32.
- Pegg, A. E., H. Xiong, et al. (1998). "S-adenosylmethionine decarboxylase: structure, function and regulation by polyamines." Biochem Soc Trans 26(4): 580-6.
- Pera, P. J., D. L. Kramer, et al. (1986). "Comparison of the biological effects of four irreversible inhibitors of ornithine decarboxylase in two murine lymphocytic leukemia cell lines." Cancer Res 46(3): 1148-54.
- Poulin, R., J. A. Secrist, 3rd, et al. (1989). "Effect of 1-amino-oxy-3-aminopropane on polyamine metabolism and growth of L1210 cells." Biochem J 263(1): 215-21.
- Rahiala, E. L., M. Kekomaki, et al. (1971). "Inhibition of pyridoxal enzymes by L-canaline." Biochim Biophys Acta 227(2): 337-43.
- Raul, F. (2007). "Revival of 2-(difluoromethyl)ornithine (DFMO), an inhibitor of polyamine biosynthesis, as a cancer chemopreventive agent." Biochem Soc Trans 35(Pt 2): 353-5.
- Rezanka T, Sigler K. (2008). Biologically active compounds of semi-metals. Phytochemistry. 69(3):585-606.
- Rodríguez-Páez, L. (1987). "Inhibidores de la biosíntesis de poliaminas." Acta Medica XXIII: 19-38.
- Rodríguez-Páez, P.L., Baeza, R.I., Wong, R.C. (1991). Inhibidores de la ornitina descarboxilasa como agentes quimioterapéuticos potenciales. An. Esc. Nal. Cienc. Biol. Mex. 36:151-166.
- Rodríguez-Páez, L., C. Neri, et al. (1998). "La δ -N-yodoacetil-ornitina y la ϵ -yodoacetil-lisina como inhibidores irreversibles dirigidos al sitio activo de la ornitina descarboxilasa." An.Esc.Nac.Cienc.Biol.Mex. 44(99-115).
- Salas, J. (2000). Nutrición y Dietética Clínica. Dieta y poliaminas. E. España. España.

- Seiler, N., Delcros, J. G. (1996). Polyamine transport in mammalian cells. An uptade. Int. J. Biochem. Cell. Biol. 28:843-861.
- Seiler, N. and F. Raul (2005). "Polyamines and apoptosis." J Cell Mol Med 9(3): 623-42.
- Shantz, L. M. and V. A. Levin (2007). "Regulation of ornithine decarboxylase during oncogenic transformation: mechanisms and therapeutic potential." Amino Acids 33(2): 213-23.
- Sjöberg S, Carlsson J, Ghaneolhosseini H, Gedda L, Hartman T, Malmquist J, Naeslund C, Olsson P, Tjarks W. (1997). Chemistry and biology of some low molecular weight boron compounds for boron neutron capture therapy. J Neurooncol. 33(1-2):41-52.
- Sjoerdsma, A. and P. J. Schechter (1984). "Chemotherapeutic implications of polyamine biosynthesis inhibition." Clin Pharmacol Ther 35(3): 287-300.
- Stevens, L. (1980). Inhibitors of the biosynthesis of putrescine, spermidine and spermine. Polyamines in biomedical research. I. J.M. New york: 167-183.
- Teti, D., M. Visalli, et al. (2002). "Analysis of polyamines as markers of (patho)physiological conditions." J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci 781(1-2): 107-49.
- Thomas, T. and T. J. Thomas (2001). "Polyamines in cell growth and cell death: molecular mechanisms and therapeutic applications." Cell Mol Life Sci 58(2): 244-58.
- Tracy, J.W., Webster, L.T. (1996). Drugs used in the chemotherapy of protozoal infections: Tripanosomiasis, Leishmaniasis, Amebiasis, Giardiasis, Trichomoniasis and other protozoal infections. In the pharmacological basis of therapeutics. McGraw Hill. Chapter 41. pp 992-993.
- Trujillo-Ferrara J, Koizumi G, Munoz O, Joseph-Nathan P, Yanez R (1992) Antitumor effect and toxicity of two new active-site-directed irreversible ornithine decarboxylase and extrahepatic arginase inhibitors. Cancer Lett 67:193–197.

- Velasco, B., Trujillo-Ferrara, J.G., Fabila-Castillo, L.H., Miranda, R., Sánchez-Torres, L.E. (2008). In vitro apoptotic activity of 2,2-diphenyl-1,3,2-oxozaborolidin-5-ones on L5178Y cells. Life Sci. 80: 1007-1013.
- Wallace, H. M. and A. V. Fraser (2004). "Inhibitors of polyamine metabolism: review article." Amino Acids 26(4): 353-65.
- Wallace, H. M., A. V. Fraser, et al. (2003). "A perspective of polyamine metabolism." Biochem J 376(Pt 1): 1-14.
- Wallace, H. M. and K. Niiranen (2007). "Polyamine analogues - an update." Amino Acids 33(2): 261-5.
- Zou, H., C. Tai, et al. (2002). "A new simple and rapid electrochemical method for the determination of hydroxyl radical generated by Fenton reaction and its application." Anal Bioanal Chem 373(1-2): 111-5.