

32. Salud Humana

Determinación de la actividad anti-proliferativa y liberadora de óxido nítrico de derivados de furoxano para su potencial uso como anti-tumorales

Pérez, Florencia; Orientadoras: López, Gloria Virginia; Hernández, Paola.

floperezlobo@gmail.com

Facultad de Ciencias

Universidad de la República

Resumen

En las últimas décadas la sobrevida de pacientes con cáncer de vejiga músculo invasivo no ha mejorado y ninguna de las terapias que han sido aprobadas para otros tipos de cáncer ha sido aprobada para el tratamiento de esta patología. Por tanto, existe una gran necesidad de investigar nuevas posibilidades terapéuticas para lograr tratamientos eficaces. Debido a la importancia que se le ha dado al desarrollo de nuevos compuestos liberadores de óxido nítrico (NO) para el tratamiento del cáncer urotelial, hemos evaluado la actividad antiproliferativa de compuestos liberadores de NO en la línea celular 253J derivada de cáncer metastásico de vejiga y resistente al quimioterápico cisplatino. Este trabajo describe la determinación de la actividad antiproliferativa *in vitro* a través de la medida de la actividad metabólica y la masa celular junto con la actividad liberadora de NO utilizando un ensayo en tándem para la misma muestra empleando los ensayos de resazurina, sulforodamina B y Griess. Adicionalmente, se evaluó el posible mecanismo de acción de los compuestos a través del ensayo cometa. Los resultados obtenidos muestran que dos de los compuestos evaluados presentaron una importante actividad antiproliferativa y selectividad hacia la línea celular 253J respecto al quimioterápico cisplatino. Los estudios sobre el posible mecanismo de acción de estos compuestos indican que la liberación de NO es la responsable de la actividad antiproliferativa y que dicho radical actúa por un mecanismo independiente del daño al ADN. Estos resultados sugieren que estos compuestos podrían considerarse nuevos líderes moleculares para el tratamiento del cáncer de vejiga.

Palabras clave: furoxano, óxido nítrico, antiproliferativos, cáncer de vejiga

Introducción

El cáncer de vejiga es una de las anomalías malignas más comunes del tracto urinario. En la incidencia mundial ocupa el noveno puesto, siendo el sexo masculino el más afectado. Está fuertemente asociado a factores ambientales, ocupacionales, y al consumo de tabaco (Babjuk, 2011; Ploeg, 2009; American Cancer Society; Xiaoxin, 2011). La mayoría de los casos de cáncer de vejiga son carcinomas de las células de transición y estos pueden ser de bajo grado de tipo no invasivo, o de alto grado los cuales pueden expandirse invadiendo la capa muscular y generando una metástasis de las células cancerosas. Ambos tipos de cáncer suelen mostrar recidiva luego del tratamiento (American Cancer Society, 2018; National Cancer Insititute, 2018).

Los tratamientos que se utilizan usualmente abarcan la cirugía, quimioterapia, radioterapia, inmunoterapia y la terapia intravesical pudiendo efectuarse una combinación de estos (American Cáncer Society, 2018).

Si bien existen avances en la investigación del tratamiento de este tipo cáncer como las terapias dirigidas o la administración de la quimioterapia combinada, los tratamientos que se utilizan actualmente logran la supervivencia de un número pequeño de

pacientes que pueden controlar la enfermedad a largo plazo (Bellmunt, 2012; Weintraub, 2014; Sternberg, 2013) Es por esto que es de suma importancia la búsqueda e investigación de nuevos fármacos para lograr tratamientos con mayor eficacia.

El óxido nítrico (NO) es capaz de inhibir el crecimiento de células tumorales mediante la inducción de la apoptosis, inhibición de la angiogénesis y metástasis, y sensibilización frente a la quimio, radio o inmunoterapia. Elevadas concentraciones de NO pueden ser generadas por furoxanos liberadores de NO los cuales han mostrado una importante actividad anticancerígena (Cerecetto, 2005; Huang, 2017). Recientemente se han desarrollado compuestos químicos híbridos análogos de tocoferol conteniendo furoxanos liberadores de NO con importante actividad antiproliferativa en varios tipos de cáncer (Gagic, 2016; Ingold, 2018).

En este trabajo evaluamos la actividad liberadora de óxido nítrico y antiproliferativa de una serie de compuestos desarrollados por nuestro grupo de investigación para su potencial uso en el tratamiento del cáncer de vejiga. De esta manera, seleccionamos furoxanos liberadores de NO (FNO y FNO1), compuestos híbridos análogos de tocoferol-furoxano (FNO5, FNO5d, FNO6

y FNO6d) y un derivado furazano carente de la acción liberadora de NO (Farrar, 1964; López, 2005; López, 2007; Cabrera, 2011) (Figura 1).

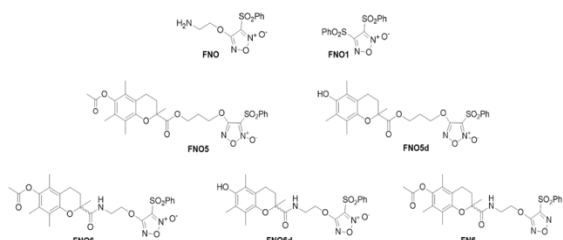


Figura 1. Estructura química de los compuestos estudiados.

Estos compuestos fueron evaluados en la línea celular derivada de cáncer metastásico de vejiga 253J, caracterizada por su alta propensión a la invasión celular y su resistencia al quimioterápico cisplatino, utilizando un ensayo en tándem que combina el ensayo de Griess para determinar liberación de NO, junto con la actividad antiproliferativa mediante resazurina y sulforodamina B (Sun, 2003; Silva, 2011). De esta forma, cuantificamos la actividad liberadora de NO y la actividad antiproliferativa mediante la actividad metabólica y contenido proteico en una misma muestra celular de forma rápida, sencilla, económica y reproducible, evitando la variación asociada con los diferentes ensayos y cambios de las condiciones externas. Por último evaluamos el posible mecanismo de acción de los compuestos utilizando el ensayo cometa (Singh, 1988; Olive, 2006).

Objetivos

-Evaluar la actividad liberadora de óxido nítrico y antiproliferativa de derivados de furoxano, compuestos híbridos análogos de tocoferol-furoxano y un derivado furazano a través de la puesta a punto de un ensayo en tándem que comprende 3 técnicas: Griess, resazurina, sulforodamina B, utilizando la línea celular derivada de cáncer de vejiga 253J.

-Determinar la actividad anti-proliferativa de los compuestos en queratinocitos inmortalizados HaCaT y determinar la selectividad de los compuestos hacia las células tumorales.

-Determinar el posible mecanismo de acción de los compuestos más activos mediante ensayo cometa.

Materiales y Métodos

Compuestos liberadores de NO

Se seleccionaron dos furoxanos (FNO y FNO1), cuatro compuestos híbridos análogos de tocoferol-furoxano (FNO5, FNO5d, FNO6 y FNO6d) y un derivado furazano carente de la acción liberadora de NO. Los compuestos disueltos en DMSO fueron utilizados para preparar las concentraciones a evaluar deseadas (1.6 - 50.0 μ M) en medio de cultivo completo. La concentración final de DMSO en los ensayos fue del 1%.

Cultivos celulares

Las líneas celulares: 253J (derivada de cáncer metastásico de vejiga) y HaCaT (queratinocitos humanos inmortalizados) se cultivaron en McCoy 5A y DMEM respectivamente, suplementados con 10 % de suero fetal bovino y 1% de penicilina-estreptomicina. Los cultivos celulares fueron crecidos en botellas para cultivo celular de 25 cm³ en una incubadora a 37 °C y 5% de CO₂.

Para los ensayos, se partió de cultivos celulares en fase exponencial, y se sembraron las placas de 96 pocillos con 5.000 células 253J y 8.000 células HaCaT por pocillo. Las células se incubaron por 24 hs a 37 °C y 5 % CO₂. Se retiró el medio de cultivo de la placa de 96 pocillos y se adicionaron 200 µL por pozo de cada solución de compuestos. El control utilizado fue medio de cultivo con DMSO al 1 %. El cultivo celular de 253J se incubó por 1.5, 3 y 24 h, mientras que HaCaT sólo a 24 h a 37 °C y 5 % CO₂.

Ensayo de Griess

Luego de cumplidos los tiempos de incubación (1.5, 3, y 24 h), se tomaron 50 µL de medio de cultivo de cada uno de los pocillos con células 253J y se transfirieron a una nueva placa de 96 pocillos. Se añadió 50 µL de la solución de sulfanilamida al 1 % en 5% de ácido fosfórico y se incubó por 10 minutos protegido de la luz. Luego, se prosiguió

con la adición de 50 µL solución de NED (0.1% de N-1-naftiletilendiamina dihidrocloruro en agua) y se incubó por 10 minutos en la oscuridad. Inmediatamente, se midió la absorbancia a 540 nm en el equipo Varioskan. Paralelamente se realizó una curva de calibración con NaNO₂ a diluciones seriadas entre 0-100 µM. A partir de la curva de calibración se determinó la concentración de NO liberado por cada uno de los compuestos.

Ensayo de Resazurina

Finalizadas las 24 h de incubación, se descartó el medio de cultivo remanente en la placa con células 253J o HaCaT y se agregaron 100 µL de la solución de resazurina 0.025 mg/mL a cada pocillo, dejando al menos 3 pocillos con PBS como control. Se incubó la placa por 4h en oscuridad a 37 °C y 5 % CO₂ y se midió la fluorescencia (excitación 530 nm y emisión 590 nm)

Ensayo de sulforodamina B

Una vez finalizado el ensayo anterior, las células fueron fijadas y se adicionó la solución de sulforodamina B 0.5 %. La placa se incubó por 1 h a 37°C. A continuación se descartó la solución de sulforodamina B, se lavó, secó a 37 °C y el colorante remanente en los pocillos se disolvió en una solución de Tris-base 10 mM. La absorbancia fue medida a 510 nm y 620 nm.

Actividad antiproliferativa con hemoglobina

Para determinar la contribución del NO en la actividad antiproliferativa, evaluamos los compuestos FNO y FNO5 en la línea celular cancerígena 253J en ausencia y presencia de hemoglobina. Las células fueron pretratadas con hemoglobina (Hb) (0, 50, 100 μM) por 1 hora y luego tratadas con 50 μM de los compuestos FNO y FNO5 por 24 horas. Posteriormente, el medio de cultivo fue descartado y las células fijadas seguido por el ensayo de sulforodamina B como se describió anteriormente.

Ensayo cometa

Las células 253J se sembraron a una densidad de 5.000 células por pozo en placa de 96 pocillos y se adicionó la solución de cada uno de los compuestos a 50 μM en medio de cultivo completo a por sextuplicado y se incluyeron los siguientes controles: H_2O_2 a 100 μM , medio de cultivo completo y medio de cultivo completo con DMSO 1%. A continuación, las células se incubaron durante 3 h a 37 grados y 5% de CO_2 . Pasado este tiempo, las células se levantaron y se generó un pool con las seis replicas. Las células se centrifugaron y 20 μL del pellet resuspendido en PBS se mezcló con 80 μL de agarosa de bajo punto de fusión 0,5 % y se adicionaron a los portaobjetos.

Luego las células se lisaron en buffer de lisis frío y se incubaron durante 1 h a 4°C. A continuación los portaobjetos fueron lavados con PBS. Se armó la cuba electroforética con buffer de electroforesis. Los portaobjetos se dejaron en contacto con la solución por 15 min con la fuente apagada para permitir el desenrollamiento del ADN. Pasados el tiempo se realizó la electroforesis a 0,7 V y 300 mA durante 15 min en la oscuridad. Al terminar los portaobjetos se lavaron con buffer de neutralización y se guardaron en una cámara húmeda hasta el análisis. Los portaobjetos fueron teñidos con 50 μL de yoduro de propidio (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y se analizaron usando el programa Comet Image (MetaSystems). Se midieron al menos 50 núcleos por portaobjetos (dos portaobjetos por tratamiento). El daño se cuantificó como el momento de la cola del cometa Olive, que representa el grado de daño del ADN en células individuales (el producto de la fracción de ADN migrado y la distancia entre la mediana de la cabeza y la mediana de la cola del cometa).

Resultados y Discusión

Actividad liberadora de óxido nítrico

Se cuantificó la liberación de NO a 1.5, 3 y 24 hs por parte de los compuestos evaluados a 50 μM en la línea celular 253J. Los resultados fueron expresados como la tasa de producción de nitrito

(NO₂⁻ principal producto de descomposición del NO) respecto al control de DMSO.

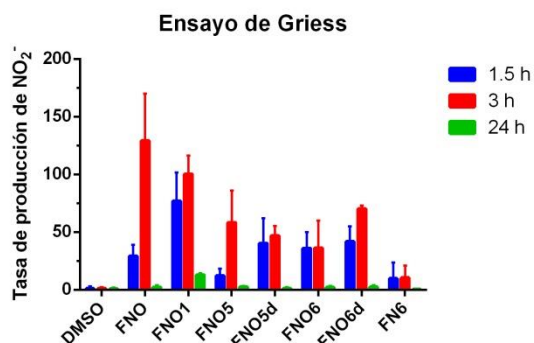


Figura 2. El ensayo de Griess muestra la tasa de producción de NO₂⁻ producido en células 253J tratadas con 50 μM de compuestos durante 1.5, 3 y 24 h.

De acuerdo a los resultados obtenidos, pudo observarse la liberación de NO por parte de los compuestos a partir de 1.5 h de incubación y en la mayoría de los casos un pico de liberación de NO a las 3 h de incubación. Los compuestos que se destacan con mayor liberación de NO fueron FNO y FNO1 superando la liberación del control con DMSO en más de 100 veces. El resto de los compuestos evaluados, FNO5, FNO5d, FNO6 y FNO6d mostraron una tasa de liberación de NO de alrededor de 50 veces más que el control DMSO. Se observa que el furazano FN6, análogo de FNO6 deoxigenado, carece de actividad liberadora de óxido nítrico, tal como como era de esperarse de acuerdo a su estructura química.

Actividad antiproliferativa.

La actividad antiproliferativa fue determinada mediante el ensayo de resazurina y sulforodamina B. Para ello las líneas celulares 253J y HaCaT fueron incubadas por 24 h, con los compuestos químicos estudiados (1.6 a 50.0 μM) y con el quimioterápico de referencia cisplatino (10 a 320 μM) como control positivo. A partir de las RFU (unidades relativas de fluorescencia) obtenidas en el ensayo de resazurina y la absorbancia obtenida en el ensayo de sulforodamina B, se determinó el porcentaje de inhibición del crecimiento celular respecto a las células control tratadas con DMSO al 1%. Mediante los gráficos de dosis-respuesta obtenidos (figuras 4, 5 y 6), se determinaron los valores de IC₅₀ (concentración de compuesto que inhibe el 50% del crecimiento celular) por análisis de regresión lineal para el ensayo de resazurina (tabla 1) y para el ensayo de sulforodamina B (tabla 2). Luego con las IC₅₀ calculadas para 253J y HaCaT se determinó el índice de selectividad (IS) del compuesto estudiado hacia la línea celular cancerígena respecto a la línea celular normal (tablas 1 y 2).

Tabla 1. Valores de IC₅₀ en μM para las líneas: 253J y HaCaT determinadas por el ensayo de resazurina. Todos los valores mostraron un desvío estándar de alrededor de 1,1. Índice de selectividad (IS) IC₅₀ HaCaT/IC₅₀ 253J.

Comp.	253J	HaCaT	IS
FNO	7.60	34.46	4.53
FNO1	7.30	4.58	0.63
FNO5	4.94	25.12	5.09
FNO5d	8.32	6.70	0.81
FNO6	11.12	5.68	0.51
FNO6d	5.32	4.83	0.91
FN6	> 50.00	29.63	-
Cisplatino	86.82	23.97	0.28

Tabla 2. Valores de IC₅₀ en μM para las líneas celulares: 253J y HaCaT determinadas por el ensayo de sulforodamina B. Todos los valores mostraron un desvío estándar de alrededor de 1,1. Índice de selectividad (IS) IC₅₀ HaCaT/IC₅₀ 253J.

Comp.	253J	HaCaT	IS
FNO	5.65	35.38	6.26
FNO1	5.47	3.60	0.66
FNO5	4.44	22.25	5.01
FNO5d	6.25	5.93	0.95
FNO6	10.38	5.33	0.54
FNO6d	3.37	4.06	1.21
FN6	> 50.00	15.22	-
Cisplatino	63.84	21.55	0.34

De acuerdo a los resultados mostrados en las tablas 1 y 2, podemos observar que los métodos empleados resazurina y sulforodamina B, mostraron resultados similares en cuanto a la actividad antiproliferativa de los compuestos evaluados, siendo por lo general, la sulforodamina B es más sensible que la

resazurina. En cuanto a los valores de IS obtenidos, se destacan los compuestos FNO y FNO5 que resultaron ser 18 y 15 veces más selectivos hacia la línea 253J respectivamente que el quimioterápico de referencia cisplatino.

En base a la estructura química y la actividad biológica observada en gráficos de dosis-respuesta de los compuestos FNO y FNO1 (figura 3) podemos ver que el compuesto FNO sustituido por un grupo amino electrón dador posee gran actividad antiproliferativa y selectividad hacia 253J, mientras que FNO1 sustituido por un grupo sulfona con propiedades electrón aceptoras, presenta una importante actividad antiproliferativa para 253J, sin embargo, presenta toxicidad hacia la línea celular HaCaT.

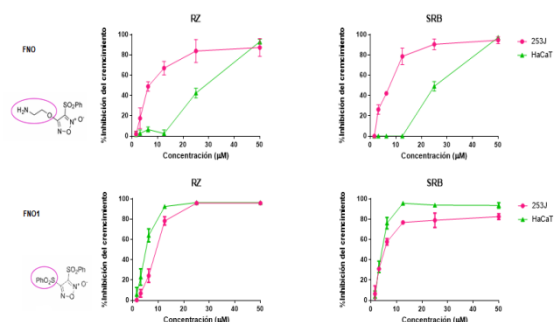


Figura 3. Estructuras de FNO y FNO1 y sus graficos de dosis-repuesta (% inhibición del crecimiento vs concentración en μM) mediante resazurina (RZ) y sulforodamina B (SRB) en las líneas celulares 253J y HaCaT.

La figura 4 muestra la importante actividad antiproliferativa y gran selectividad hacia

la línea celular 253J respecto a la línea celular normal obtenida para el compuesto FNO5 sustituido con grupo éster con propiedades electrón atrayentes muestra.

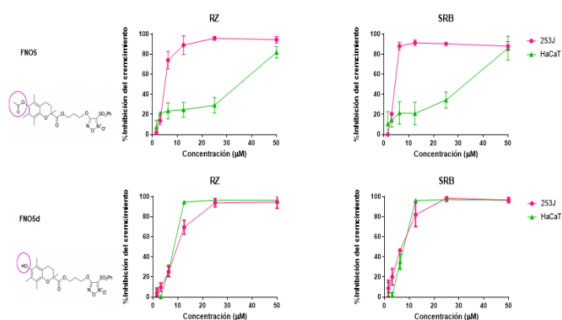


Figura 4. Estructuras de FNO5 y FNO5d y sus graficos de dosis-repuesta (% inhibición del crecimiento vs concentración en µM) mediante resazurina (RZ) y sulforodamina B (SRB) en las líneas celulares 253J y HaCaT.

Por el contrario, el compuesto FNO5d sustituido con un grupo alcohol con propiedades electrón dadoras ejerce una acción antiproliferativa muy similar hacia las dos líneas celulares estudiadas, sin selectividad hacia la línea celular cancerígena.

Si comparamos la actividad antiproliferativa obtenida para compuesto FNO6 (figura 5) sustituido por un grupo éster con propiedades electrón atrayentes, con el compuesto FNO6d sustituido por un grupo alcohol electrón dador, vemos que este último posee mayor actividad antiproliferativa en 253J que la que presenta el FNO6. Sin embargo ninguno de los dos compuestos mostró

selectividad en 253J respecto a la línea celular normal.

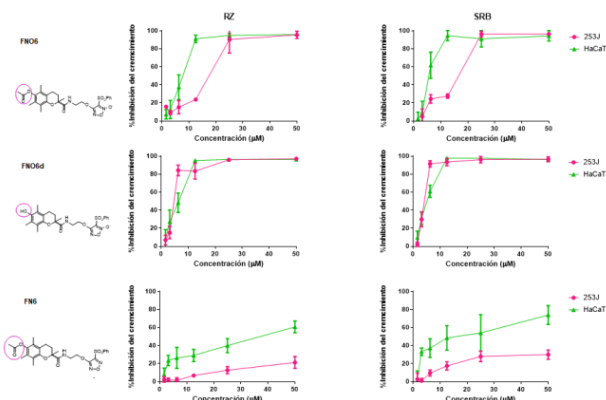


Figura 5. Estructuras de FNO6, FNO6d y FN6 y sus correspondientes gráficos de dosis-repuesta (% inhibición del crecimiento vs concentración en µM) obtenidos mediante resazurina (RZ) y sulforodamina B (SRB) en las líneas celulares 253J y HaCaT..

El compuesto FN6, análogo deoxygenado de FNO6, no mostró actividad antiproliferativa hacia la línea celular cancerígena 253J, siendo además tóxico para la línea celular normal HaCaT. Los resultados obtenidos para el derivado furazano FN6, indican que la liberación del óxido nítrico es la responsable de la actividad antiproliferativa.

De acuerdo a las anteriores observaciones, podemos observar que la acción liberadora de óxido nítrico parece ser necesaria para obtener la actividad antiproliferativa de células tumorales, mientras que las propiedades electrónicas de los grupos funcionales que presentan las moléculas pueden influir en la selectividad de los compuestos.

Finalmente, se estudió la correlación entre ambos métodos empleados graficando los resultados de todos los valores de IC_{50} obtenidos para los dos ensayos (figura 6).

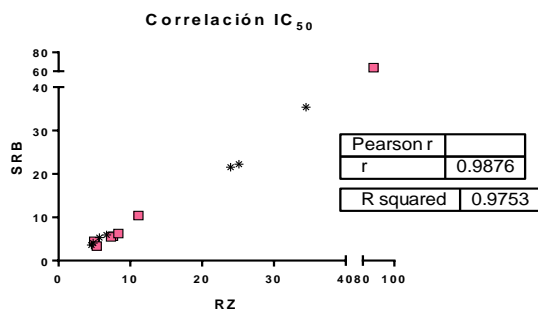


Figura 6. Correlación entre los métodos de resazurina y sulforodamina B en 253J (□) y HaCaT (*).

El gráfico indica una excelente correlación entre la actividad antiproliferativa determinada por el método de resazurina y sulforodamina B. Este resultado es apoyado por el coeficiente de Pearson de 0.9876 y un R^2 de 0.9753.

Actividad antiproliferativa en presencia de hemoglobina

Para investigar la contribución de la liberación de NO en la actividad antiproliferativa de los compuestos, evaluamos el efecto de FNO y FNO5 en la proliferación de la línea celular cancerígena 253J en ausencia y presencia de hemoglobina, un atrapador de NO. La figura 7 muestra el porcentaje de inhibición de crecimiento respecto al control DMSO de FNO y FNO5 en

presencia de concentraciones crecientes de Hb.

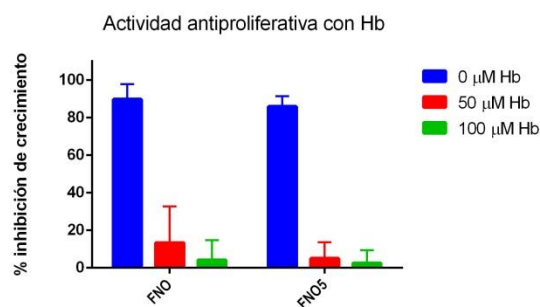


Figura 7. Actividad antiproliferativa de los compuestos FNO y FNO5 en ausencia y presencia de hemoglobina (Hb) en células 253J.

Puede observarse que el pretratamiento de las células con hemoglobina reduce notoriamente la acción antiproliferativa de los compuestos. Estos resultados indican que la actividad liberadora de NO contribuye a la inhibición del crecimiento de las células derivadas de cáncer de vejiga 253J.

Ensayo cometa

De acuerdo a los resultados de liberación de NO y actividad antiproliferativa, seleccionamos los compuestos FNO y FNO5 para evaluar la posible acción genotóxica ejercida por el NO sobre la línea celular 253J mediante el ensayo cometa en condiciones alcalinas. Para ello las células fueron incubadas con los compuestos a una concentración de 50 μ M durante 3 h donde se observó el pico máximo de liberación de NO en el ensayo de Griess. Se realizaron dos preparados por condición y se contaron al menos 50

células en cada uno de ellos. Los momentos de cola de Olive que fueron cuantificados a través del programa Comet Imager se muestran a continuación (Figura 8).

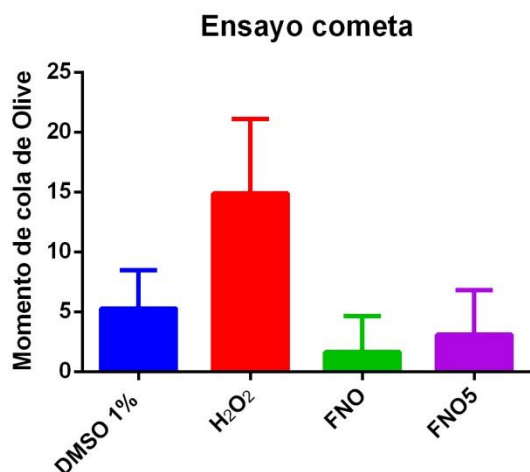


Figura 8. Ensayo cometa representado por los valores de los momentos de cola de Olive obtenidos en la línea celular 253J tratada con DMSO, H₂O₂ y los compuestos FNO y FNO5 a 50 µM durante 3 h.

De acuerdo al gráfico se observa que los compuestos tienen un comportamiento similar al control negativo DMSO 1%, mientras que el control positivo H₂O₂ provoca un aumento en el momento de cola de Olive. Estos resultados nos permiten concluir que la actividad antiproliferativa ejercida por los compuestos FNO y FNO5 es dependiente de la liberación de NO, mientras que su mecanismo de acción se da por un mecanismo independiente de la acción genotóxica.

Conclusiones

En este trabajo desarrollamos un ensayo en tándem

Griess / resazurina / sulforodamina B el cual es sumamente útil para la evaluación de la producción de NO y la actividad antiproliferativa (actividad metabólica y la masa celular) de forma consecutiva utilizando la misma muestra, evitando variabilidad entre ensayos independientes, minimizando los tiempos y a un menor costo. Los dos métodos que utilizamos para determinar la acción anti proliferativa, resazurina y sulforodamina B, mostraron resultados similares y una excelente correlación entre ambos.

Utilizando esta metodología, se evaluaron exitosamente dos derivados de furoxano, cuatro compuestos híbridos análogos de tocoferol-furoxano y un derivado furazano en la línea celular derivada de cáncer metastásico de vejiga y resistente al quimioterápico cisplatino 253J y la línea celular normal HaCaT. A excepción del derivado deoxigenado FN6, todos compuestos evaluados presentaron mejor actividad antiproliferativa que el cisplatino. Dentro de estos, se destacaron los compuestos FNO y FNO5 que presentaron una importante actividad liberadora de NO, antiproliferativa y selectiva hacia la línea celular 253J.

De acuerdo a los resultados de actividad antiproliferativa obtenidos para el derivado deoxigenado FN6 y a los estudios en

ausencia y presencia y de hemoglobina para FNO y FNO5, podemos concluir que la liberación de NO es necesaria para obtener la actividad antiproliferativa deseada por un mecanismo de acción independiente del efecto genotóxico.

Teniendo en cuenta la resistencia que presenta 253J frente al cisplatino, los compuestos FNO y FNO5 pueden considerarse como nuevos líderes moleculares y abren una nueva perspectiva hacia el rediseño de nuevos compuestos para la terapia anticancer.

Bibliografía

- Babjuk, M., Oosterlinck, W., Sylvester, R., Kaasinen, E., Böhle, A., Palou-Redorta, J., y Rouprêt, M. (2011). EAU Guidelines on Non-Muscle-Invasive Urothelial Carcinoma of the Bladder, the 2011 Update. *Eur. Urol*, 59(6), 997-1008. doi: 10.1016/j.eururo.2011.03.017.
- Bellmunt, B., y Petrylak, D.P. (2012). New Therapeutic Challenges in Advanced Bladder Cancer. *Seminars in Oncology*, 39(5), 598-607.
- Cabrera, M., López, G.V., Gómez, L.E., Breijo, M., Pintos, C., Botti, H., Raymondo, S.,...Cerecetto, H. (2011). Genetic toxicology and preliminary *in vivo* studies of nitric oxide donor tocopherol analogs as potential new class of antiatherogenic agents. *Drug Chem. Toxicol.*, 34(3)285-293. doi: 10.3109/01480545.2010.536769.
- American Cancer Society (2018) Bladder cancer. Atlanta, EU.: American Cancer Society. Recuperado de <https://www.cancer.org/cancer/bladder-cancer.html>
- Cerecetto, H., y Porcal, W. (2005). Pharmacological Properties of Furoxans and Benzofuroxans: Recent Developments. *Mini. Rev. Med. Chem*, 5(1), 57-71, doi: 10.2174/1389557053402864.
- Farrar, W.V. (1964). The 3,4-bisarenesulphonylfuroxans. *J. Chem. Soc.*, 904. doi: 10.1039/JR9640000904.
- Gagic, Z., Nikolic, K., Ivkovic, B., Filipic, S., y Agbaba, D. (2016). QSAR studies and design of new analogs of vitamin E with enhanced antiproliferative activity on MCF-7 breast cancer cells. *J. Taiwan Inst. Chem*, 59 33-44. doi: 10.1016/j.jtice.2015.07.019.
- Huang Z, Fu J Zhang Y (2017). Nitric Oxide Donor-Based Cancer Therapy: Advances and Prospects. *J. Med. Chem.*, 60(18), 7617-7635. doi: 10.1021/acs.jmedchem.6b01672
- Ingold, M., Dapueto, R., Victoria, S., Galliusi, G., Batthyany, C., Bollati-Fogolín, M., Tejedor, D.,... Lopez, G.V. (2018). A green multicomponent synthesis of tocopherol analogues with antiproliferative activities. *Eur. J. Med. Chem*, 143(1), 1888-1902. doi: 10.1016/j.ejmech.2017.11.003.
- López, G.V., Batthyány, C., Blanco, F., Botti, H., Trostchansky, A., Migliaro, E., Radi, R.,...Rubbo, H. (2005). Design, synthesis, and biologcharacterization of potential antiatherogenic nitric oxide-

- releasintocopherol analogs. *Bioorg. Med. Chem.*, 13(20), 5787-5796. doi: 10.1016/j.bmc.2005.05.060.
- López, G.V., Blanco, F., Hernández, P., Ferreira, A., Piro, O., Batthyány, C., González, M.,...Cerecetto, H. (2007). Second generation of a-tocopheranalogs-nitric oxide donors: synthesis, physicochemical, biological characterization. *Bioorg. Med. Chem.*, 15(18), 6262-6272. doi: 10.1016/j.bmc.2007.06.019.
- National Cancer Institute (2018). Tratamiento del cáncer de vejiga. Maryland, EU.: NHI. Recuperado de <https://www.cancer.gov/>.
- Olive, P.L.; Banáth, J.P. (2006) The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells. *Nat. Protoc.* 1(1), 23-29, doi: 10.1038/nprot.2006.5.
- Ploeg, M., Aben, K. K., y Kiemeney, L. A. (2009). The present and future burden of urinary bladder cancer in the world. *World J Urol*, 27(3), 289-293. doi: 10.1007/s00345-009-0383-3.
- Silva, F.S.G., Starostina, I.G., Ivanova, V.V., Rizvanov, A.A., Oliveira, P.J., y Pereira, S.P. (2016). Determination of metabolic viability and cell mass using a tandem resazurin/sulforhodamine B assay. In Assessment of cell toxicity. *Curr. Protoc. Toxicol.* 68:2.24.1-2.24.15, doi: 10.1002/cptx.1.
- Singh, N.P.; McCoy, M.T.; Tice, R.R.; Schneider, E.L. (1988) A Simple Technique for Quantitation of Low Levels of DNA Damage in Individual Cells. *Exp. Cell Res.* 175(1), 184-191, doi: 10.1016/0014-4827(88)90265-0.
- Sun J, Zhang XJ, Broderick M, Fein H (2003). Measurement of nitric oxide production in biological systems by using Griess reaction assay. *Sensors* 3: 276–284.
- Sternberg, C.N., Bellmunt, J., Sonpavde, G., Siefker-Radtke, A.O., Stadler, W.M., Bajorin, D.F.,...Quinn, D.I. (2013). ICUD-EAU International Consultation on Bladder Cancer 2012: Chemotherapy for urothelial carcinoma-neoadjuvant and adjuvant settings. *Eur. Urol*, 63(1), 58-66. doi: 10.1016/j.eururo.2012.08.010
- Weintraub, M.D., Li, Q.Q., y Agarwal, P.K. (2014). Advances in intravesical therapy for the treatment of non-muscle invasive bladder cancer. *Mol.Clin. Oncol*, 2(5), 656-660. doi: 10.3892/mco.2014.314
- Xiaoxin, S.Xu., Wang, L., Abrams, J., y Wang, G. (2011). Histone deacetylases (HDACs) in XPC gene silencing and bladder cancer. *J. Hematol.Oncol.* 4(17), 1-11. doi: 10.1186/1756-8722-4-17.

Agradecimientos

Facultad de Ciencias Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.
Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable.
PEDECIBA Química, Uruguay.