



Universidad de la República
Facultad de Química-Facultad de Ciencias



***Flavonoides y análogos como moduladores de
enzimas detoxificantes de xenobióticos. Potenciales
agentes quimiopreventivos para el cáncer***

-OCTUBRE 2012-

Lic. Mauricio Cabrera

Tesis Doctoral en Química, Facultad de Química, Udelar

Tutores: Dres. Mercedes González y Hugo Cerecetto

A Ileana y Olivia



Universidad
de Navarra

A Mercedes y Hugo, por guiarme en este trabajo y por su calidez humana.

A mis compañeros del Laboratorio de Química Orgánica, los que están, los que estuvieron y los nuevos integrantes, como son muchos no quiero caer en el error de olvidarme de alguno, cada uno sabe lo que significó para mí en todo este tiempo. Quiero agradecer en especial a los que me acompañaron siempre: Vicky, Williams, María Laura, Alicia, Paola, Laura C, Guzmán y Natalia.

A los nuevos integrantes que toman esta línea de trabajo, Stefani y Marcos.

A Marcelo Fernández por darme una mano con los experimentos in vivo.

A los integrantes de la UBC por los ratos compartidos, en especial a Mariela Bollati por aceptarme en su grupo, a Ines Tiscornia por los consejos y a Soledad Astrada por ayudarme con la inmunocitoquímica.

A Horacio Pezaroglio, por los espectros de RMN.

A la Dra. Adela López de Ceráin, y los integrantes del Laboratorio de Toxicología, UNAV.

A mis compañeros y amigos, por las alegrías y los buenos momentos, en especial a Andrés por darme ánimo en los momentos difíciles.

A mis padres y hermanos por apoyarme siempre.

A mi familia política por estar cuando los necesité.

A Olivia por hacerme tan feliz en estos últimos meses.

A Ileana por el amor, las fuerzas, por Oli y por todo.

A todos muchas, muchas gracias, porque sin uds. hubiera sido imposible.

Resumen	7
Abreviaturas	8
INTRODUCCIÓN	9
<u>CÁNCER</u>	10
GENERALIDADES DEL CANCER	10
EPIDEMIOLOGÍA DEL CÁNCER	13
ETIOLOGÍA DEL CÁNCER	15
<i>Factores Químicos</i>	16
<i>Factores Virales, Físicos y Hereditarios</i>	19
<u>QUIMIOPREVENCIÓN DEL CÁNCER</u>	20
CONCEPTOS Y EVOLUCIÓN HISTÓRICA	20
MECANISMOS DE ACCIÓN DE LOS AGENTES QUIMIOPREVENTIVOS	22
<i>Actividades Bloqueantes de Carcinógenos</i>	22
<i>Actividades Antioxidantes y Antiinflamatorias</i>	24
<i>Actividades Antiproliferativas</i>	25
LA VÍA DE REGULACIÓN Keap1-Nrf2	27
<i>El Elemento ARE, el Factor NRF2 y el Represor Keap1</i>	27
<i>Mecanismos Reguladores de la Vía Keap1-Nrf2</i>	29
<i>Vía Keap1-Nrf2 en la Protección frente a Xenobióticos: Inductores Monofuncionales y Bifuncionales</i>	32
OBJETIVOS	34
ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN	36
<u>ANTECEDENTES PROPIOS EN EL TEMA</u>	37
<u>DESARROLLO Y PROPUESTA DE TRABAJO</u>	43
SERIE I	44
Productos Derivados de la Chalcona A1	44
SERIE II	44
Productos Derivados de las Chalconas A2 y A10	44
SERIE III	45
<i>Combinación de dos Farmacóforos Inductores de Enzimas Detoxificantes en la Misma Estructura Química</i>	45
<i>Ditioltionas</i>	46
<i>Oxoanálogos</i>	48

ACTIVIDAD BIOLÓGICA	51
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	52
<u>BÚSQUEDA DE NUEVAS ENTIDADES FARMACOFÓRICAS</u>	53
<u>SÍNTESIS DE LOS DERIVADOS PERTENECIENTES A LA SERIE I</u>	62
<u>SÍNTESIS DE LOS DERIVADOS PERTENECIENTES A LA SERIE II</u>	63
<u>SÍNTESIS DE LOS DERIVADOS PERTENECIENTES A LA SERIE III</u>	68
<u>MATERIALES Y MÉTODOS QUÍMICOS</u>	72
CONSIDERACIONES GENERALES	72
SERIE I	73
<i>Procedimiento General de Síntesis de Chalconas de Serie I</i>	73
SERIE II	77
<i>Procedimiento General de Síntesis de Chalconas de serie II (SII-1 –SII-4)</i>	77
<i>Procedimiento general de síntesis de Chalconas de serie II (SII-5 – SII9)</i>	80
SERIE III	82
<i>Procedimiento General de Síntesis de Chalconas de Serie III</i>	82
<u>EVALUACIÓN BIOLÓGICA</u>	86
SCREENING DE ACTIVIDAD MONOFUNCIONAL DE ENZIMAS DE FASE II	86
DETERMINACIÓN DE ÍNDICE DE QUIMIOPREVENCIÓN	96
ESTUDIO DE TRANSLOCACION DE NRF2 AL NÚCLEO	98
DETERMINACIÓN DE CITOTOXICIDAD SOBRE LINEAS CELULARES TUMORALES	99
ESTUDIOS DE MUTAGENICIDAD MEDIANTE TEST DE AMES	101
ENSAYO DEL COMETA	105
ESTUDIOS IN VIVO	108
PARTE EXPERIMENTAL BIOLÓGICA	111
GENERALIDADES	111

EXPERIMENTACIÓN EN LÍNEAS CELULARES	111
<i>Criopreservación/Revitalización</i>	111
<i>Recuento y Evaluación de Viabilidad Celular</i>	112
<i>Análisis de Citotoxicidad</i>	112
<i>Tratamiento y Purificación Citosólica para Screening de Actividad QR</i>	113
ESTUDIOS DE MUTAGENIDAD MEDIANTE TEST DE AMES	113
Recuento en Placa de TA98	114
ENSAYO DEL COMETA O ELECTROFORESIS EN GEL DE CÉLULAS INDIVIDUALES	114
ESTUDIOS EN ANIMALES	115
<i>Purificación de Fracción Citosólica y Microsomal in vivo</i>	116
DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD QUINONA REDUCTASA	116
DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD GLUTATIÓN S-TRANSFERASA	117
DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD EROD MEDIADA POR CYP	117
CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS	117
INMUNOCITOQUIMICA	118
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	118
 CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	 119
 ANEXO	 122
Optimización de un modelo de <i>screening</i> que permita evaluar la capacidad moduladora de enzimas detoxificantes de xenobióticos	123

Resumen

La quimioprevención del cáncer involucra la prevención, retraso o reversión de los procesos de carcinogénesis a través de la ingesta de alimentos o agentes farmacéuticos. Uno de los mecanismos de protección contra la carcinogénesis es la inducción de enzimas involucradas en el metabolismo de carcinógenos, particularmente enzimas detoxificantes de fase II como glutatión S-transferasa (GST) y quinona reductasa (QR). La quimioprevención también se puede conseguir mediante la inhibición de la familia de enzimas citocromo P450 (CYP), ya que ciertas isoformas tienen la capacidad de activar compuestos procarcinógenos volviéndolos dañinos para las células. Se han encontrado diversos compuestos naturales y sintéticos que son capaces de inducir en distinto grado las enzimas de fase II. En este trabajo se han sintetizado y evaluado en cuanto a su capacidad inductora y toxicidad, nuevos compuestos de la familia de los flavonoides que podrían actuar como agentes quimiopreventivos. Se estudiaron análogos de chalconas abarcando un amplio rango de propiedades fisicoquímicas, principalmente variando el grupo arilo a modo de anillo A y B de las chalconas. Se analizaron los efectos de tres series de compuestos en la sobreexpresión de enzimas de fase II, encontrándose algunos inductores monofuncionales que actúan a través de la vía Nrf2-ARE. Se corrobora la actividad in vivo luego de la administración intragástrica de estos compuestos a ratas Wistar sobre la actividad de las enzimas GST, QR y CYP hepáticas. Se estudia además la genotoxicidad mediante test de Ames y ensayo cometa, obteniendo resultados auspiciosos para estas propiedades. Además, se ensaya la actividad antitumoral in vitro de algunos derivados interesantes.

Δ - Calentamiento a reflujo	EM - Espectrometría de masa
% sup - Porcentaje de supervivencia	EP - Éter de petróleo (fracción 40-65 °C)
4'BrF - 4'-bromoflavona	EROD - O-deetilación de etoxiresorufina
β NF - β -Naftoflavona	Et ₂ O - Éter etílico
Abs - Absorbancia	EtOH - Etanol
AcOEt - Acetato de etilo	Fx- Furoxano
ADN - Ácido desoxiribonucleico	GSH - Glutación reducido
Ah - acrónimo del inglés <i>Aryl hydrocarbon</i>	GST - Glutación S-transferasa
Al ₂ O ₃ - Alúmina	HAc - Ácido acético
ARE ó EpRE - Elemento de respuesta a antioxidantes/ a electrófilos	HMBC - Experimento bidimensional de correlación heteronuclear a distancia
ARN- Ácido ribonucleico	HMQC - Experimento bidimensional de correlación heteronuclear a un enlace
Arnt - acrónimo del inglés <i>Ah receptor nuclear translocator</i>	IC ₅₀ - Concentración inhibitoria del 50%
BaP - 10 α -epoxi-7,8,9,10-tetrahidrobenzo[a]pireno	IC - Índice quimiopreventivo (IC ₅₀ /CD)
Bfx - Benzofuroxano	Keap1 - acrónimo del inglés Kelch-like ECH-associated protein 1.
BHA - <i>tert</i> -butilhidroxianisol	QR – Quinona Reductasa
BHT - di- <i>tert</i> -butilhidrotolueno	QT - Quimiotipo
BSA - Seroalbúmina bovina	MeOH -Metanol
CC - Cromatografía en columna	MS - Espectroscopía de masas
CD - Concentración (μ M) necesaria para duplicar la actividad QR	ND - No determinado
CDNB - 1-cloro-2,4-dinitrobenceno	NR - Número de revertientes His -
CYP ó CYP450 - Citocromo P450	Nrf-2 - acrónimo del inglés NF-E2 related factors.
DCPIP - 2,6-diclorofenolindofenol; ox: oxidado, red:reducido	RMN- Resonancia magnética nuclear
DE - Desviación Estándar	SiO ₂ - Sílica gel
DMBA - 9,10-dimetil-1,2-benzoantraceno	THF – Tetrahidrofurano
DMEM - Medio Dulbecco's Modified Tagle	TLC – Cromatografía en capa fina
DMSO - Dimetilsulfóxido	Tris - tris(hidroximetil)aminometano
DMSO - Dimetilsulfóxido	wt - acrónimo del inglés wild type
EDTA - Ácido etilendiaminetetracético	

INTRODUCCIÓN

CÁNCER

GENERALIDADES DEL CANCER

El cáncer fue descrito por primera vez por Hipócrates como “karkinos” (del griego cáncer que significa cangrejo). Galeno introdujo la palabra neoplasia recién en el siglo II, definiéndola como el crecimiento de un área corporal adversa a la naturaleza. Fue el cirujano inglés Percivall Pott quién en 1775 observó por primera vez una relación causal entre la exposición a ciertas sustancias ambientales y el desarrollo de neoplasmas. Describió la ocurrencia de alteraciones tipo cancerosas en la piel del escroto de los deshollinadores como consecuencia de la exposición prolongada al hollín. Muchos años después en 1915, fue publicado el primer trabajo experimental en carcinogénesis química por el patólogo Katsusaburo Yamaguiw, quién observó el desarrollo de papilomas y carcinomas en orejas de conejos luego de repetidas aplicaciones de alquitrán.¹

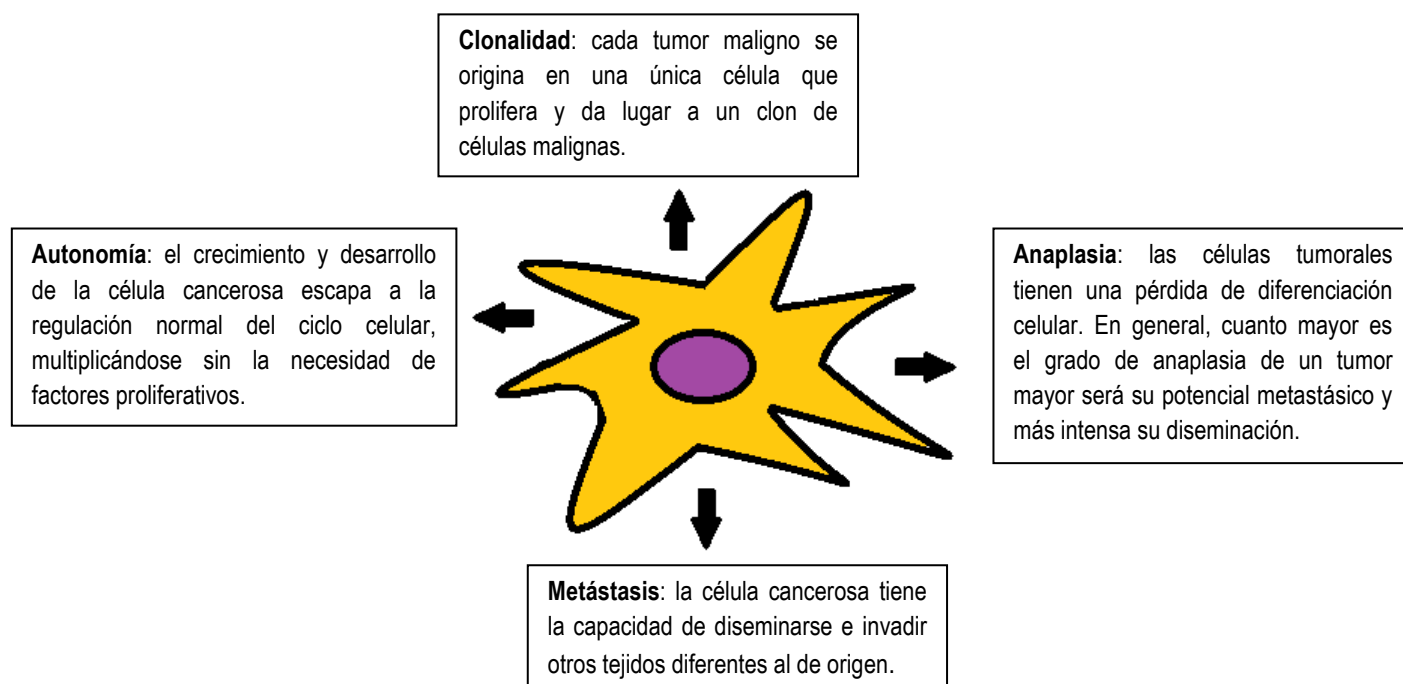
Actualmente, es reconocido que el cáncer constituye un grupo heterogéneo de enfermedades neoplásicas de etiología multifactorial cuyo factor común es un desequilibrio en la relación proliferación/ muerte celular, provocado por una división descontrolada de células malignas que escapan a los mecanismos de control del ciclo celular, adquiriendo la capacidad de invasión y destrucción tisular. Cada tipo de cáncer difiere de forma variable en su histogénesis, morfología, evolución clínica y pronóstico.

El proceso de carcinogénesis puede originarse a partir de cualquier tipo de célula, al producirse la ruptura del equilibrio celular normal a favor de la acumulación de células de manera generalmente progresiva e involucrando varios factores, tanto genéticos como ambientales, que convierten la célula normal en un clon de células neoplásicas que forman una masa denominada tumor o *neoplasma*. Si las células neoplásicas permanecen agrupadas en una masa única, se dice que el tumor es **benigno**. Esto significa que las células anormales aún no se han diseminado hacia otros tejidos, por lo que mediante extirpación quirúrgica del tumor puede lograrse la curación. Un tumor se considera canceroso cuando es **maligno**, es decir, cuando las células neoplásicas adquieren la capacidad de invadir el tejido circundante, formando tumores secundarios o **metástasis** en otros lugares del cuerpo.²

¹ Oliveira, P. A.; Colaco, A.; Chaves, R.; Guedes-Pinto, H.; De-la-Cruz, L.; Lopes, C. Chemical carcinogenesis. *Annals of the Brazilian Academy of Sciences*, 2007, 79(4): 593-616.

² Alberts, B.; Bray, D.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Watson, J. D. *Biología molecular de la célula*. Ediciones Omega S.A., 3ª Edición. Barcelona. 1996. pág. 1346.

Las células cancerosas presentan cuatro características principales, representadas en el siguiente esquema³:



Existen diferentes tipos de cánceres y la terminología que se emplea deriva de las células o tejidos donde se originan. Los **sarcomas** proceden del tejido conectivo como huesos, cartílagos, nervios, vasos sanguíneos y músculos; mientras los **carcinomas** proceden de tejidos epiteliales como la piel, los epitelios que tapizan las cavidades y órganos corporales y los tejidos glandulares de mama y próstata. Un tercer tipo lo constituyen las **leucemias y linfomas**, diversas formas de cáncer de los sistemas hematopoyético e inmunitario. A su vez, cada una de estas categorías tiene diferentes subdivisiones de acuerdo con el tipo celular que le dió origen, la localización en el cuerpo y la estructura del tumor. Aproximadamente el 90% de los cánceres humanos son carcinomas, quizás porque la mayor parte de la proliferación celular del cuerpo se produce en los epitelios, o quizás porque los tejidos epiteliales están expuestos más frecuentemente a las diversas formas de lesión física y química que favorecen el desarrollo del cáncer.^{2,3}

El proceso de carcinogénesis puede dividirse en tres etapas principales (figura 1.1)⁴:

- **Iniciación:** es la etapa en la cual ocurre una alteración genética de la célula. De manera general la mayoría de las neoplasias se inician por mutaciones o expresión anormal de genes que cumplen funciones en el metabolismo y proliferación celular, apoptosis y reparación del ADN. La iniciación del proceso de carcinogénesis es modulada tanto por agentes exógenos como endógenos.

³ Cajaraville, G.; Carrera, M. J.; Massó, J.; Tamés, M. J. Oncología. En Farmacia Hospitalaria. Editorial Médica Internacional S.A., 3ª Edición. Madrid. 2002. pág. 1171-1175.

⁴ Domínguez, L. Principios generales de carcinogénesis: carcinogénesis química y hormonal. *Biocancer*, 2004, 1:1-9.

- **Promoción:** consiste en la expansión selectiva de las células iniciadas. Los agentes que la promueven producen alteraciones en las vías de transducción de señales celulares, por lo que su mecanismo de acción reside en una alteración de la expresión génica mediada por receptores específicos. Es un proceso reversible tanto a nivel de la expresión génica como a nivel celular y no se producen alteraciones estructurales directas en el ADN. La eficiencia de esta etapa es sensible a la edad de la célula y a factores dietarios y hormonales.
- **Progresión:** en esta etapa la célula iniciada se convierte en una célula potencialmente maligna. Este proceso es irreversible y las células que lo iniciaron se distinguen a nivel molecular por su alteración en la estructura genómica que se refleja en la inestabilidad cariotípica (aparición de aberraciones cromosómicas, trastorno del aparato mitótico, de la función de los telómeros, hipometilación del ADN, recombinación, amplificación y transposición génica aberrantes). La progresión puede ocurrir a partir de células en etapa de promoción o directamente a partir de células normales como resultado de la administración de dosis elevadas (citotóxicas) de agentes carcinogénicos.

Posteriormente, con las divisiones celulares sucesivas de la población tumoral iniciada se van añadiendo nuevas mutaciones que alteran otras funciones celulares y otorgan la capacidad de invasión, angiogénesis y metastización. La metástasis consta de una serie de etapas secuenciales complejas, tras la transformación neoplásica, la proliferación progresiva de las células neoplásicas se ve favorecida inicialmente por los nutrientes que aporta el microentorno del órgano. Conforme la masa va creciendo, la neovascularización o angiogénesis se hace necesaria. La síntesis y secreción de diferentes moléculas angiogénicas y la supresión de moléculas inhibitoras son responsables de la formación de una red de capilares que nace del tejido huésped circundante. Algunas células tumorales pueden inhibir la expresión de moléculas cohesivas y adquirir una mayor movilidad, separándose así de la lesión primaria. Los capilares y las vénulas de pared delgada constituyen las rutas más frecuentes para la entrada de las células tumorales al torrente circulatorio. La gran mayoría de las células tumorales que pasan al torrente sanguíneo son destruidas, pero aquellas que sobreviven son capaces de adherirse a las células endoteliales de los capilares o a membranas basales subendoteliales expuestas, extravasándolas y penetrando en el parénquima del órgano. Las células tumorales que presentan los receptores celulares adecuados en su superficie pueden responder a factores de crecimiento parácrinos y, de esa forma proliferar en el parénquima del órgano.⁵

⁵ DeVita, V. T.; Hellman, S.; Rosenberg, S. A. Cancer principles and practice of oncology. Lippincott Williams & Wilkins, 6ª Edición. Filadelfia. 2001. pág. 123-136.

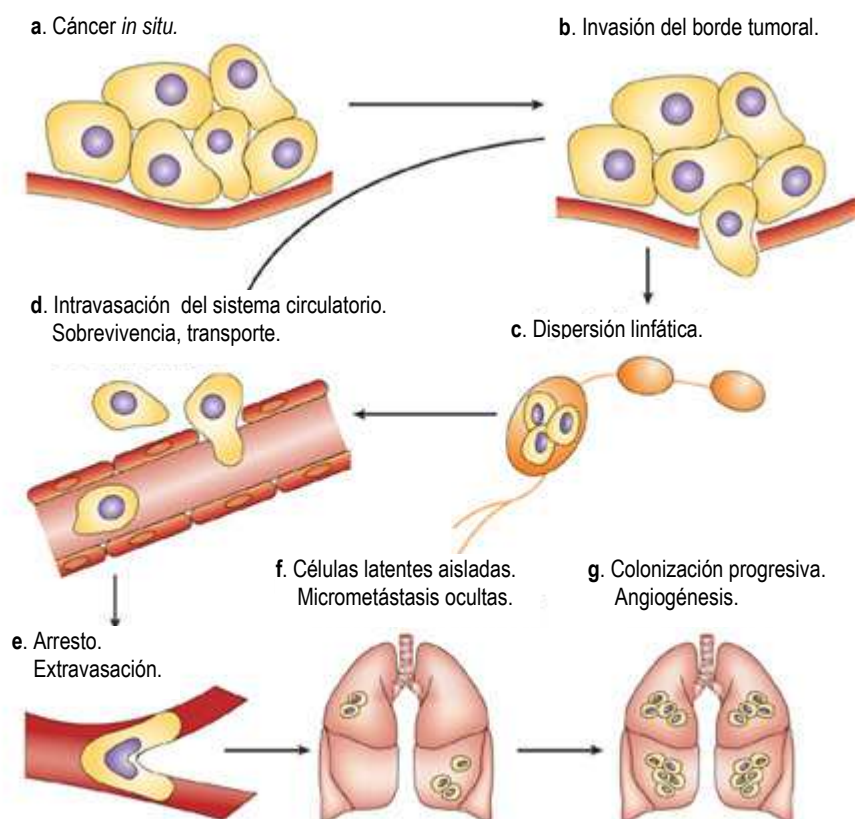


Figura 1.1 Esquema del proceso secuencial metastásico. Adaptado de ⁷

EPIDEMIOLOGÍA DEL CÁNCER

En el año 2008, cerca de 12.7 millones de nuevos casos y 7.6 millones de muertes se produjeron por cáncer mundialmente. Tanto en hombres como mujeres, las regiones con mayor incidencia son América del Norte, Australia, Nueva Zelanda y Europa del Norte y Oeste, como consecuencia de la alta incidencia del cáncer de próstata y de mama en hombres y mujeres, respectivamente. Algunos tipos de cáncer comunes en los países desarrollados se asocian con mejor pronóstico y nivel de supervivencia, como el cáncer de próstata, el de mama y el colo-rectal, mientras otros tienen pronósticos más comprometidos como el cáncer de hígado, estómago y esófago.⁶ El cáncer es una causa común de morbilidad y mortalidad en los adultos mayores, el 50% de las neoplasias malignas ocurren en personas de más de 70 años.⁷

⁶ GLOBOCAN 2008. Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC <http://globocan.iarc.fr/factsheets/cancers/all.asp>

⁷ Anisimov, V. N. Carcinogenesis and aging 20 years after: Escaping horizon. 2009, *Mechanisms of Ageing and Development*, 130:105–121.

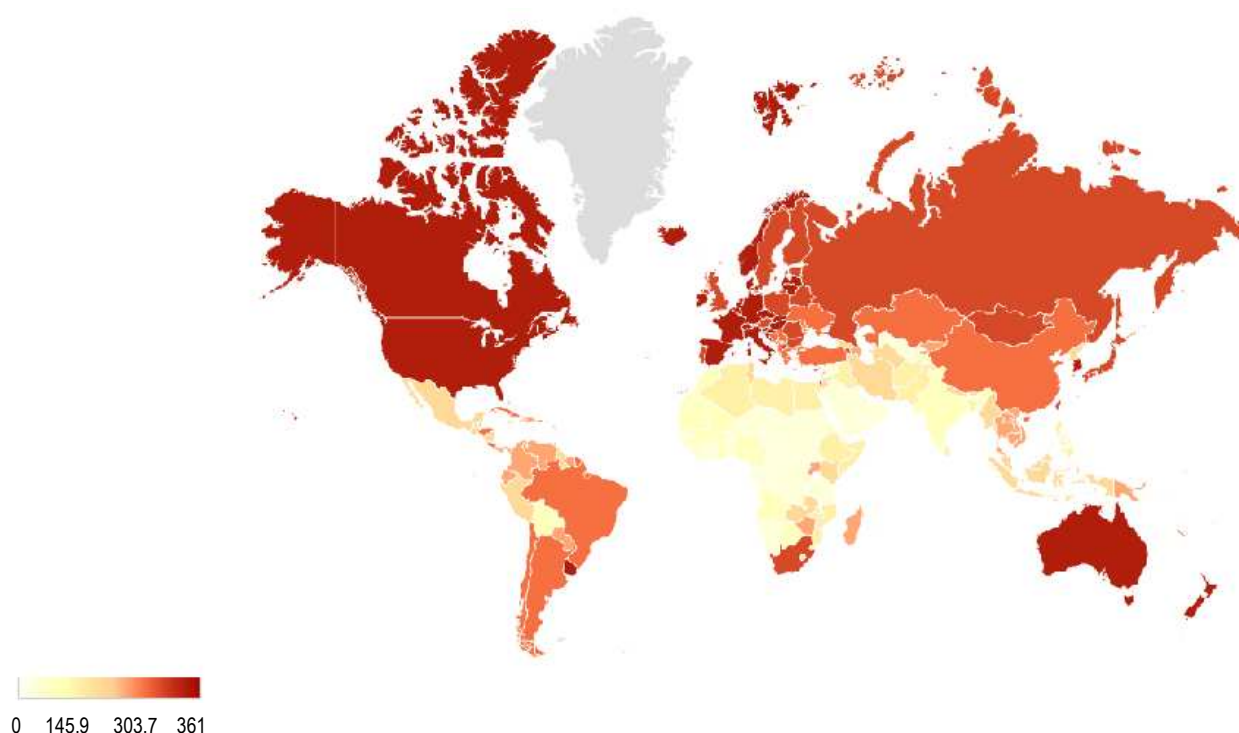


Figura 1.2. Incidencia del cáncer a nivel mundial. Se incluyen todos los tipos de cáncer (excepto cáncer de piel no melanoma). Las tasas están estandarizadas por edad, expresadas como número de casos cada 100.000 habitantes. Este esquema corresponde a la incidencia para la población masculina, las tasas y regiones de incidencia para la población femenina son muy similares. Adaptado de ⁶

En nuestro país el cáncer constituye una de las principales causas de muerte general, luego de los accidentes de tránsito y las patologías cardiovasculares, ubicándose entre los países con mayor incidencia a nivel mundial (figura 1.2).⁶

En un estudio realizado en Uruguay donde se efectúa un relevamiento de la incidencia de diferentes tipos de cáncer entre los años 2002 - 2006 en todos los departamentos de nuestro país y discriminado por franjas etarias, se observa que los principales tipos de cáncer son los mismos que se registran a nivel mundial, siendo el cáncer de próstata, pulmón y colo-recto los más frecuentes en hombres y el de mama, colo-recto y cuello uterino los más frecuentes en mujeres (figura 1.3).⁸

⁸ Barrios, E.; Vasallo, J. A.; Alonso, R.; Garau, M.; Musseti, C. III Atlas de Incidencia de Cáncer en el Uruguay 2002-2006. Registro Nacional del Cáncer, Comisión Honoraria de Lucha Contra el Cáncer, 2010:14-15.

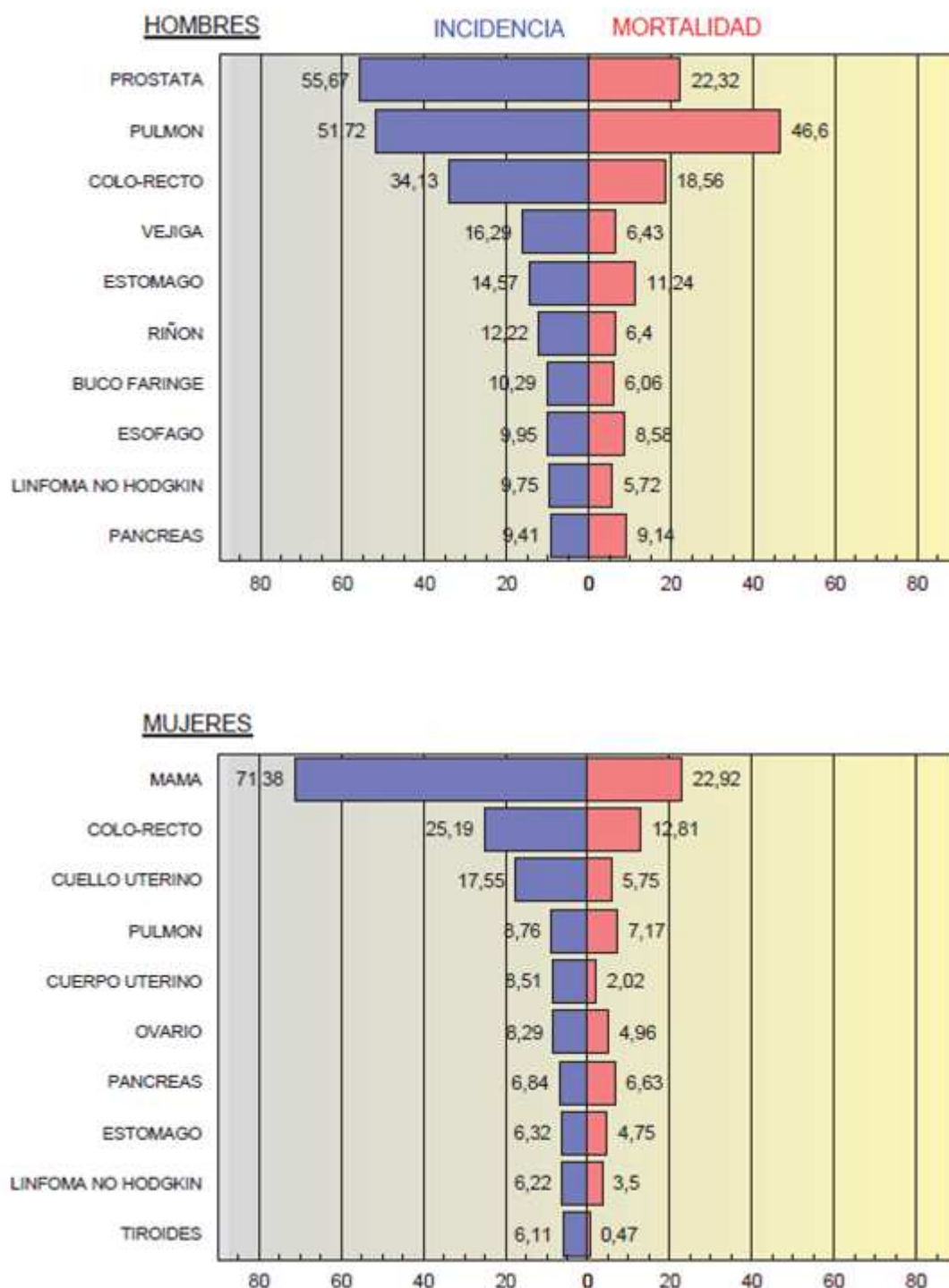


Figura 1.3. Incidencia y mortalidad por cáncer discriminada por sexo en la población uruguaya. Las tasas están estandarizadas por edad, expresadas como número de casos cada 100.000 habitantes. Adaptado de ⁸

ETIOLOGÍA DEL CÁNCER

El término carcinógeno hace referencia a aquellos compuestos capaces de estimular la sucesión de eventos que llevan al desarrollo del cáncer.¹ La etiología del cáncer es el estudio de las causas o factores que desencadenan

la carcinogénesis, e involucra a los agentes causantes del cáncer, que pueden ser sustancias químicas, radiaciones o virus, los factores biológicos que incrementan o reducen el riesgo de cáncer, como la inflamación, los mecanismos de reparación del ADN y las respuestas inmunitarias, y también los rasgos del comportamiento humano y los estilos de vida que influyen sobre el riesgo de desarrollar esta enfermedad, tomando en cuenta las interacciones entre el componente genético de los individuos o poblaciones, y los factores causales tanto externos como internos. Nos centraremos en los **factores químicos** que contribuyen a la etiología del cáncer, y luego comentaremos brevemente los factores virales, físicos y hereditarios.

Factores Químicos

El hábito de fumar es responsable del 90 % de los cánceres de pulmón en hombres de todo el mundo. El humo de tabaco contiene más de 3500 especies químicas, de las cuales más de 20 son carcinógenas. Estas incluyen PAHs, *N*-nitrosoaminas, aminas aromáticas, óxido de etileno, 1,3-butadieno y especies reactivas del oxígeno. Algunos de los carcinógenos químicos más conocidos se detallan en la tabla 1.1.

Una clasificación de los carcinógenos químicos los separa en 2 grupos: aquellos que interaccionan directamente con el ADN y aquellos que requieren una metabolización enzimática para ser activos, y se los conoce como *procarcinógenos*. Otros autores los clasifican según su mecanismo de acción en genotóxicos y no-genotóxicos (mitogénicos) (figura 1.4). Los carcinógenos genotóxicos, es decir que causan daño directo al ADN, poseen alta reactividad química o pueden ser metabolizados a intermedios reactivos. Estos forman aductos covalentes con macromoléculas biológicas, como el ADN, en el núcleo y mitocondria. Los carcinógenos genotóxicos pueden transferir grupos alquilo simples o complejos (arilalquilo) a sitios específicos de las bases del ADN. Estos agentes alquilantes o arilalquilantes incluyen, pero no se limitan, a *N*-nitrosocompuestos, epóxidos alifáticos, aflatoxinas, mostazas, hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAHs) y otros productos de combustión de la materia vegetal y de combustibles fósiles. Otros transfieren al ADN residuos arilamínicos, como por ejemplo: aminas aromáticas, colorantes aminoazóicos y aminas heterocíclicas aromáticas. Los carcinógenos no genotóxicos actúan en la fase de promoción y no requieren activación metabólica, no reaccionan directamente con el ADN, no forman aductos y no son mutagénicos en los ensayos de laboratorio. En general modulan el crecimiento y la muerte celular, potenciando los efectos de los carcinógenos genotóxicos.¹ Los pesticidas sintéticos y herbicidas caen dentro de este grupo, así como también un gran número de productos naturales. En general estos agentes son carcinogénicos a altas dosis y requieren exposición prolongada. Su mecanismo de acción es multifactorial, alterando como resultado final la homeostasis celular, lo que puede proveer un ambiente adecuado para la expansión selectiva de un clon neoplásico. En algunos casos, estos carcinógenos pueden

tener efectos hormonales directos o inducir los mecanismos de mutagénesis endógena, como por ejemplo la depurinización del ADN.⁹

Tabla 1.1 Algunos carcinógenos químicos conocidos en humanos, su mecanismo de acción y principales órganos afectados. Adaptado de ¹.

Grupo	Compuestos	Mecanismo de acción	Órganos afectados/ Tipo de cáncer
Hidrocarburos policíclicos aromáticos	Benzo(a)pireno, bifenilos policlorinados	Formación de aductos con purinas en el ADN	Piel, pulmones, estómago, hígado
Aminas y amidas aromáticas	2-acetilaminofluoreno, 4-aminobifenilo, 2-naftilamina	Genotóxicos, incrementan tasa de duplicación celular	Hígado, vejiga
Aminoazoderivados	o-Aminoazotolueno, N, N-dimetil-4-aminoazobenceno	Forman aductos con el ADN y la hemoglobina	Hígado, vejiga, pulmones
Compuestos N-nitrosos	N-nitroso dimetilamina	Forman aductos con átomos de N y O en las bases del ADN	Hígado, pulmones, riñones
Carbamatos	Ésteres de N-metilcarbamato	Provocan aberraciones cromosómicas y transformación celular	Degeneración de hígado, riñones, testículos
Compuestos halogenados	Tricloroetileno	Mutaciones somáticas, alteración del ciclo celular	Cáncer de riñón, hígado, pulmones
Carcinógenos naturales	Aflatoxina B1, asbestos	Forman aductos con guaninas, reaccionan con el ARN y las proteínas	Hígado, pulmones
Metales	Arsénico, cadmio, níquel	Estrés oxidativo, inhiben mecanismos de reparación del ADN, promueven acetilación de histonas e hipermetilación del ADN	Piel, pulmones, hígado, riñón, próstata, cavidad nasal (níquel)
Drogas anticancerígenas	Agentes alquilantes	Crosslinking intra e inter catenarío con el ADN	Leucemias

⁹ DeVita, V. T.; Hellman, S.; Rosenberg, S. A. Cancer principles and practice of oncology. Lippincott Williams & Wilkins, 7ª Edición. Filadelfia. 2005. pág. 165-243.

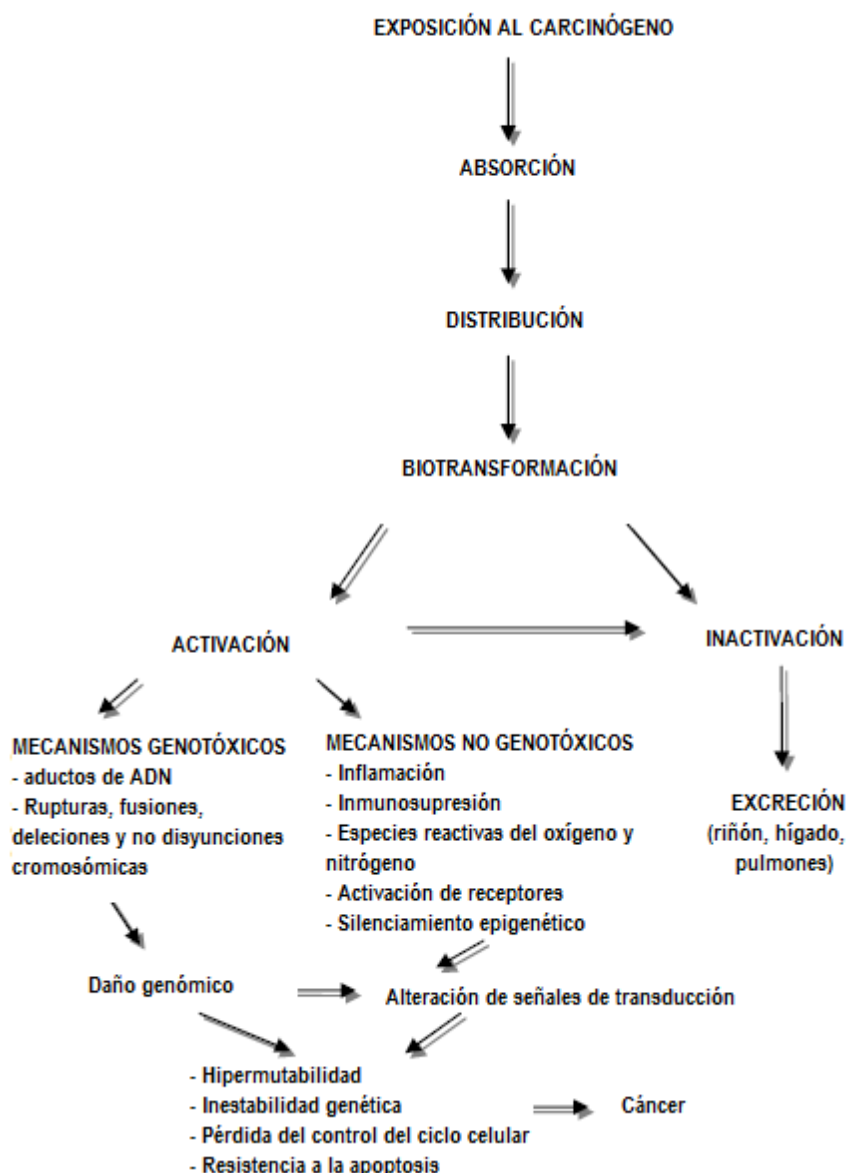


Figura 1.4. Esquema de la activación metabólica de carcinógenos químicos, y su clasificación en genotóxicos y no genotóxicos, mostrando sus posibles mecanismos de acción. Adaptado de ¹

Para los carcinógenos genotóxicos, la interacción con el ADN no es al azar y cada clase de agente reacciona selectivamente con purinas o pirimidinas, y muchas veces la selectividad queda determinada por la secuencia nucleotídica y por los procesos selectivos de reparación de errores del ADN. Como resultado, estos carcinógenos son potentes mutágenos, particularmente causando mal apareamientos de bases o pequeñas deleciones. Otros pueden causar daños macrogenéticos como ruptura cromosómica o grandes deleciones. Múltiples estudios en modelos animales han permitido conocer la contribución de varios agentes químicos como causantes de cáncer, mostrando que los agentes carcinógenos pueden activar directamente oncogenes, inactivar genes supresores de tumores y causar cambios genómicos asociados con el crecimiento autónomo,

potenciamiento de la supervivencia y modificación en el perfil de expresión génica que es requerido para un fenotipo maligno.^{10 11}

Factores Virales, Físicos y Hereditarios

Si bien varias clases de virus ADN se asocian con el desarrollo de malignidad, sólo dos miembros de las familias de virus ARN, *Retroviridae* y *Flaviviridae*, se han asociado con el desarrollo de enfermedades neoplásicas. En humanos, el virus HTLV tipo 1 (HTLV-1) parece contribuir directamente al desarrollo de la leucemia-linfoma del adulto (ATL), HIV y HCV están asociados con la malignidad humana pero probablemente contribuyan a su desarrollo de manera indirecta. La infección con el flavivirus HCV, por ejemplo, es un factor de riesgo para el desarrollo de carcinoma hepatocelular (HCC), sin embargo el rol del virus en la patogénesis no es claro, sugiriéndose que el HCC se desarrolla indirectamente como resultado del *turnover* celular que ocurre durante la respuesta inflamatoria provocada por el virus. Dentro de los virus ADN, los papilomavirus (HPVs) se vinculan con la propensión a presentar diversos tipos de cáncer de piel y cáncer cervical. Los mecanismos mediante los cuales diferentes HPVs inducen la transformación celular son variados, y generalmente involucran proteínas transformantes codificadas por el genoma viral. Otro ejemplo, el linfoma de Burkitt, endémico en los niños de África, parece estar asociado a la infección con el virus Epstein Barr (EBV) así como otros cánceres linfoides. La infección de los linfocitos B con EBV puede desencadenar potencialmente en éstos una proliferación descontrolada, producto de la sobreexpresión de genes que participan en el ciclo celular o están vinculados al crecimiento.⁹

Los carcinógenos físicos se encuentran entre los mejor caracterizados en humanos, incluyen la radiación ionizante, ultravioleta (UV) y los asbestos. La fuente de exposición a radiación más significativa proviene de procedimientos médicos como por ejemplo, la medicina nuclear, y de procedimientos terapéuticos y de diagnóstico, así como la luz UV del sol, la cual es responsable de un número creciente de cánceres de piel en todo el mundo.⁹

Muchos casos de cáncer ocurren en personas sin historia familiar de la enfermedad, sin embargo la probabilidad de que una persona desarrolle cáncer tiene una fuerte influencia genética, determinando diferentes susceptibilidades a la carcinogénesis. Por ejemplo, determinados alelos de los genes BRCA1 y BRCA2 elevan el riesgo de las mujeres que los presentan de desarrollar cáncer de mama. Otras neoplasias cuya predisposición genética ha sido estudiada son el retinoblastoma, el cáncer colo-rectal, la neoplasia endócrina múltiple (tipos I, II y III), entre otros.¹²

¹⁰ Hanahan, D.; Weinberg, R. A. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000, 100: 57–70.

¹¹ Gulezian, D.; Jacobson-Kram, D.; McCullough, C. B.; Olson, H.; Recio, L.; Robinson, D.; Storer, R.; Tennant, R.; Ward, J. M.; Neumann, D. A.. Use of transgenic animals for carcinogenicity testing: considerations and implications for risk assessment. *Toxicol Pathol*. 2000, 28(3): 482-499.

¹² Estapé, J.; González Barón, M. Oncología médica. Historia natural y factores etiológicos del cáncer. En Medicina interna. Harcourt Brace 13ª Edición. 1997. pág. 1133-1138.

QUIMIOPREVENCIÓN DEL CÁNCER

CONCEPTOS Y EVOLUCIÓN HISTÓRICA

El término **quimioprevención** fue introducido por primera vez por Sporn en 1976 haciendo referencia a la prevención del desarrollo del cáncer a través del consumo de las formas naturales de la vitamina A y sus análogos sintéticos. La quimioprevención se define actualmente como el uso de agentes específicos para revertir, suprimir o prevenir la carcinogénesis.¹³

Tres tipos de estrategia de quimioprevención apuntan a interrumpir el proceso de carcinogénesis: la **prevención primaria**, que intenta bloquear el desarrollo de malignidad *de novo*; la **prevención secundaria**, que involucra la prevención de la progresión de lesiones pre-malignas y la **prevención terciaria** que se centra en evitar la aparición de segundos tumores primarios (SPTs) en pacientes curados de un cáncer previo o en lesiones pre-malignas. La prevención primaria del cáncer es uno de los acercamientos claves al control de esta enfermedad. Esta incluye: i) evitar la exposición a agentes carcinógenos conocidos, ii) potenciar los mecanismos de defensa del hospedador, iii) modificar el estilo de vida y iv) quimioprevenir.¹⁴

Existe evidencia de que es posible prevenir el cáncer y otras enfermedades crónicas, algunas de las cuales presentan mecanismos patogénicos en común, como daño al ADN, estrés oxidativo e inflamación crónica. Un acercamiento obvio es evitar la exposición a los factores de riesgo conocidos. Como estrategia complementaria, es posible volver al organismo más resistente a los agentes carcinógenos, inhibir la progresión de la enfermedad, o ambas, mediante la administración de agentes quimiopreventivos.¹³ Un agente quimiopreventivo eficaz debería actuar en las etapas tempranas de la carcinogénesis para eliminar las células premalignas antes de que adquieran la malignidad, o proteger a las células normales del proceso de transformación.¹⁴

Muchos agentes quimiopreventivos que actúan suprimiendo la promoción y/ o progresión de las células premalignas lo hacen a través de la modulación de la proliferación o la diferenciación celular. De acuerdo al blanco celular, la mayoría de los agentes quimiopreventivos pueden clasificarse como agentes bloqueantes o como agentes supresores. Los agentes **bloqueantes** en general apuntan a prevenir la aparición de mutaciones en el ADN causadas por los carcinógenos e incluyen diversos grupos de compuestos: sustancias químicas que reducen la síntesis de carcinógenos, o que inhiben su activación metabólica o potencian su detoxificación, agentes antioxidantes que atrapan radicales libres y compuestos químicos que secuestran carcinógenos previniendo su interacción con el ADN (figura 1.5). Algunos de los mecanismos por los cuáles los agentes bloqueantes ejercen su acción son: inhibición del ingreso a las células de los compuestos carcinógenos (ej.

¹³ De Flora, S.; Fergunson, L. R. Overview of mechanism of cancer chemopreventive agents. *Mut. Res.* 2005, 591:8-15.

¹⁴ Hail, N. Jr.; Cortes, M.; Drake, E. N.; Spallholz, J. E. Cancer chemoprevention: A radical perspective. *Free Radic. Biol. Med.*, 2008, 45: 97-110.

calcio), o de su activación (ej. isotiocianatos, polifenoles); incremento de su detoxificación vía enzimas de fase II (ej. oltipraz), desfavoreciendo su unión al ADN (ej. polifenoles) o incrementando los mecanismos de reparación del ADN (ej. N-acetilcisteína, inhibidores de proteasas); eliminando o reduciendo la generación de EROs (ej. polifenoles, vitamina E, β -caroteno); inhibiendo el metabolismo del ácido araquidónico (ej. polifenoles, tamoxifeno, drogas anti-inflamatorias no esteroideas - NSAIDs), etc. Los agentes **supresores** frecuentemente interfieren con la promoción o progresión de la carcinogénesis, y su actividad quimiopreventiva se atribuye a su influencia sobre la proliferación celular, diferenciación, senescencia o apoptosis (figura 1.5). Así, algunos agentes supresores actúan modulando las vías de señalización intracelular (ej. polifenoles, retinoides, tamoxifeno, NSAIDs); la actividad de hormonas y factores de crecimiento (ej. retinoides, tamoxifeno, NSAIDs); inhibiendo la actividad de oncogenes (ej. NSAIDs, monoterpenos, genisteína); inhibiendo el metabolismo de las poliaminas (ej. difluorometilornitina, retinoides, tamoxifeno); induciendo la diferenciación celular (ej. calcio, retinoides, vitamina D); corrigiendo desbalances en la metilación del ADN (ej. ácido fólico); induciendo la apoptosis, inhibiendo la angiogénesis, etc.^{15,16} Es claro entonces que la mayoría de los agentes quimiopreventivos no actúan mediante un único mecanismo sino que participan en la modulación de varios procesos celulares.

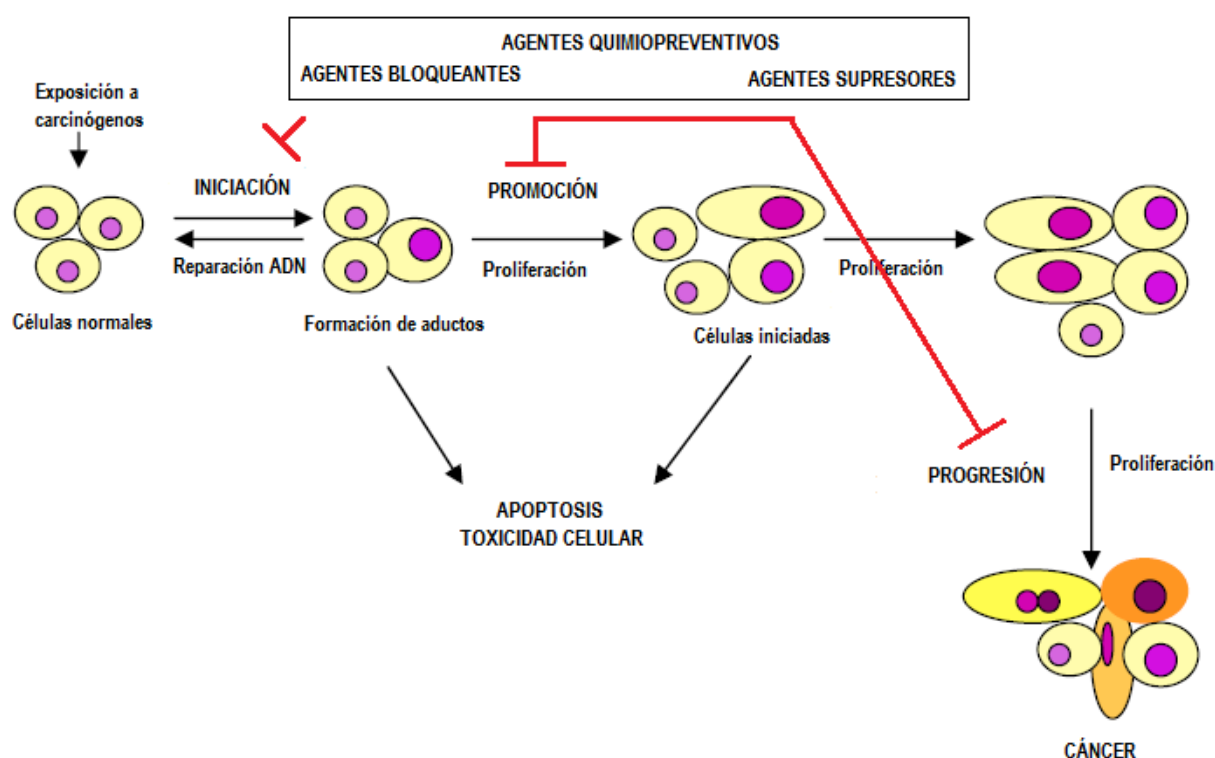


Figura 1.5. La carcinogénesis puede ser dividida en 3 etapas: iniciación, promoción y progresión. Los agentes bloqueantes inhiben la iniciación, paso en el cuál una célula normal se transforma en una célula mutada. Los agentes supresores inhiben las etapas subsiguientes que llevan a la formación del tumor maligno. Adaptado de ¹

¹⁵ Chen, C.; Kong, A.-N. T. Dietary chemopreventive compounds and ARE/EpRE signaling. *Free Radic. Biol. Med.* 2004, 36: 1505-1516.

¹⁶ Smith, J. J.; Tully, P.; Padberg, R. Chemoprevention: A primary cancer prevention strategy. *Seminars in Oncology Nursing*, 2005, 21(4):243-251.

MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS AGENTES QUIMIOPREVENTIVOS

Kelloff y colaboradores en 1996 propusieron tres grandes blancos y varios procesos a través de los cuales un agente quimiopreventivo puede actuar. Los mismos son: 1) actividades bloqueantes de carcinógenos, 2) actividades antioxidantes y 3) actividades antiproliferativas.¹⁷

Actividades Bloqueantes de Carcinógenos

- Inhibición de la absorción del carcinógeno.

Se ha descrito que las dietas ricas en calcio disminuyen la hiperproliferación del epitelio del colon. A la hiperproliferación de la mucosa de este órgano se atribuye el desarrollo de adenomas colorectales inducidos por el exceso de bilis y ácidos grasos libres en el lumen del colon. El calcio actúa como agente quelante de estos compuestos, inhibiendo su absorción a nivel del epitelio intestinal.¹⁸

- Inhibición de la formación o activación del carcinógeno.

Un buen ejemplo de este mecanismo es la inhibición de la formación de nitrosoaminas carcinógenas por vitaminas C y E (figura 1.6), las cuales bloquean la reacción entre aminas secundarias y nitrito al pH bajo del estómago.

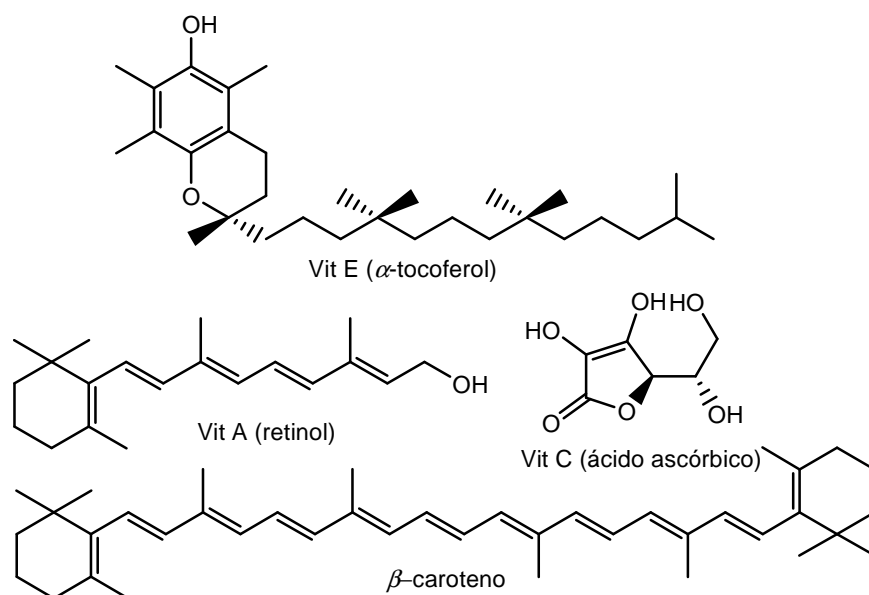


Figura 1.6. Estructura química de vitaminas A, C, y E. Se muestra también la estructura de β -caroteno, precursor de la vitamina A.

¹⁷ Kelloff, G. J.; Boone, C. W.; Steele, V. E.; Crowell, J. A.; Lubet, R. A.; Greenwald, P.; P, Hawk, E. T.; Fay, J. R.; Sigman, C. C. Mechanistic considerations in the evaluation of chemopreventive data. *IARC Sci.* 1996, 139: 203-219.

¹⁸ Pence, B. C. Role of calcium in colon cancer prevention: experimental and clinical studies. *Mut. Res.* 1993; 290: 87-95.

La formación de un carcinógeno puede también ser inhibida previniendo la activación metabólica de procarcinógenos. Muchos agentes quimiopreventivos (por ejemplo: sulfuros alílicos, isotiocianatos, arilalquilcarbamatos y flavonoides) exhiben esta actividad. Muchos compuestos que inhiben la actividad aromataasa también inhiben la carcinogénesis química en tejidos sensibles a estrógenos.¹⁹

- *Desactivación o detoxificación de carcinógenos.*

El sistema de enzimas que metabolizan xenobióticos abarcan las enzimas de fase I (oxidación, reducción e hidrólisis) y de fase II (glucuronación, sulfatación, acetilación, metilación y conjugación con glutatión). Estas enzimas pueden ser categorizadas como activadoras o detoxificantes según si su actividad metabólica produce o detoxifica carcinógenos. Un balance fisiológico entre estas enzimas, incluyendo sus niveles de expresión y polimorfismos genéticos, puede determinar la sensibilidad o riesgo de un individuo frente a la exposición a especies carcinógenas. La desactivación y detoxificación de carcinógenos constituye un mecanismo muy importante de quimioprevención.

El establecimiento de una conexión entre las enzimas detoxificantes y la carcinogénesis fue demostrado directamente por primera vez en un modelo murino *knockout* para la glutatión S-transferasa (GST).²⁰ El glutatión (GSH) es una molécula fundamental en la detoxificación de carcinógenos. Éste reacciona espontáneamente o catalizado por GSH S-transferasas con numerosos carcinógenos activados como *N*-metil-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidina (MNNG), aflatoxina B1 (AFB1), 10 α -epoxi-7,8,9,10-tetrahidrobenzo[a]pireno (BaP diol epóxido) y otros hidrocarburos policíclicos aromáticos.

Un gran número de agentes quimiopreventivos potenciales caen dentro de este grupo. Entre compuestos a destacar se encuentran sulfuros alílicos, los cuales son productos naturales encontrados en cebolla, ajo y otros vegetales del género *Allium*.²¹

Los agentes quimiopreventivos que actúan modulando la actividad de las enzimas detoxificantes se han clasificado como inductores monofuncionales o bifuncionales de las enzimas de metabolización de xenobióticos de fase I y II. Los compuestos que solamente inducen las enzimas detoxificantes de fase II son definidos como inductores monofuncionales, mientras los que inducen simultáneamente los citocromos P450 (CYP450) de fase I y las enzimas detoxificantes de fase II, se clasifican como inductores bifuncionales. Dado que estos últimos podrían potencialmente activar procarcinógenos vía inducción de la familia de enzimas CYP450, indicaría que no todos los inductores bifuncionales son adecuados como quimiopreventivos. Sin embargo, es también plausible que algunos agentes de este tipo puedan inducir más fuertemente las enzimas de fase II, respecto a las de fase I, promoviendo mayoritariamente la detoxificación y protección más que la activación de especies carcinógenas.²⁰ El Oltipraz (OPZ), al igual que otros agentes quimiopreventivos previene la formación del aducto

¹⁹ Kakizoe, T. Chemoprevention of cancer. Focusing on clinical trials. *Jpn. J. Clin. Oncol.* 2003; 33(9): 421-442.

²⁰ Chen, C.; Kong, A. T. Dietary cancer-chemopreventive compounds: from signaling and gene expression to pharmacological effects. *Trends Pharm. Sci.* 2005; 26(6): 318-326.

²¹ Mann, J. R.; DuBois, R. N. Cancer chemoprevention: myth or reality? *Drug Disc. Today: Therap. Strat.* 2004; 1(4): 403-409.

AFB1-ADN, al incrementar la conjugación de AFB1 con GST y estimular así la detoxificación de la aflatoxina B1.¹⁹

En este trabajo se profundizará en los agentes quimiopreventivos para el cáncer que actúan mediante este mecanismo, principalmente en los inductores monofuncionales, tomando como ejemplo la inducción de las enzimas glutatión S-transferasa (GST) y quinona reductasa (QR).

- *Prevención de la unión del carcinógeno al ADN y potenciación de la reparación del ADN.*

Después de la activación y formación del carcinógeno genotóxico se forman aductos ADN-carcinógeno. El impedir la formación de estos aductos es otro importante blanco para la quimioprevención. Por otro lado, una de las enzimas moduladoras de daño al ADN, la poli(ADP-ribosil) transferasa (ADPRT) es disminuida por carcinógenos: en este sentido, la *N*-Acetil-L-cisteína por ejemplo, previene la disminución de ADPRT causada por el carcinógeno 2-acetilaminofluoreno.¹⁹

Actividades Antioxidantes y Antiinflamatorias

- *“Scavengers” de radicales libres*

Las especies reactivas del oxígeno (EROs), como los radicales peróxido, anión superóxido, oxígeno singulete y radicales hidroxilos se encuentran íntimamente asociados con la carcinogénesis, actuando en cualquier fase de su desarrollo. Los radicales del oxígeno exhiben un efecto mutagénico oxidando las bases nucleotídicas, produciendo ruptura de las hebras del ADN y deleciones o rearrreglos cromosómicos. Muchos compuestos que actúan como *scavengers* de las especies reactivas del oxígeno muestran efectos quimiopreventivos. A modo de ejemplo, es bien conocida la reacción entre β -caroteno (figura 1.6) y oxígeno singulete. Los polifenoles antioxidantes actúan como *scavengers* de radicales peróxido, particularmente, la vitamina E (α -tocoferol, figura 1.6), es conocida por su efecto protector frente a radicales peróxido, oxígeno singulete y radical superóxido.¹⁹

- *Inhibición del metabolismo del ácido araquidónico.*

El ácido araquidónico (AA) es metabolizado por enzimas oxidativas, ciclooxigenasas (COXs), a prostaglandinas (PGs), tromboxanos y leucotrienos. Se han identificado dos isoformas de COXs, COX-1 y COX-2, ambas catalizan la misma reacción. COX-1 se expresa constitutivamente en la mayoría de los tejidos y es responsable de la producción de prostaglandinas que controlan las funciones fisiológicas normales incluyendo mantenimiento de la mucosa gástrica, regulación del flujo sanguíneo renal y la agregación plaquetaria. COX-2 no se expresa constitutivamente, pero es rápidamente inducida por un estímulo inflamatorio o mitogénico, lo que incrementa la síntesis de prostaglandinas en tejidos inflamados y neoplásicos.²² Numerosos trabajos ponen en evidencia la relación existente entre cáncer e inflamación. Se ha demostrado, por ejemplo, la sobreexpresión de COX-2 en células de colangiocarcinoma y en lesiones precancerosas del ducto biliar, pero no en células epiteliales biliares

²² Wu, T.. Cyclooxygenase-2 and prostaglandin signaling in cholangiocarcinoma. *Biochim. Biophys. Acta.* 2005; 1755: 135-150.

normales. Una mezcla de citoquinas proinflamatorias (IL-1 β , TNF- α e IFN- γ) induce la expresión de COX-2 en células tumorales, sugiriendo que la inducción de COX-2 puede ser un mecanismo importante mediante el cual las citoquinas pro-inflamatorias promueven la carcinogénesis.²³

Células tumorales humanas y de ratón al ser tratadas con celecoxib (figura 1.7), un inhibidor específico de COX-2, sufren apoptosis, lo que se evidencia por cambios morfológicos, activación de caspasas y liberación del citocromo c.²² El ácido acetilsalicílico (aspirina, figura 1.7), un fármaco anti-inflamatorio no esteroide (NSAIDs), es útil como agente quimiopreventivo para el cáncer de colon. Los NSAIDs, son potentes inhibidores de las ciclooxigenasas.¹⁹

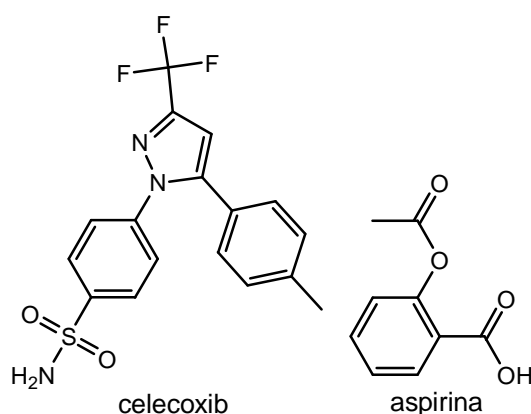


Figura 1.7. Estructura de dos inhibidores de COXs. Se muestra la estructura química de celecoxib y de ácido acetil salicílico (aspirina).

Actividades Antiproliferativas

- *Modulación de la transducción de señales, la actividad hormonal y factores de crecimiento.*

La regulación del crecimiento, proliferación y diferenciación celular involucra diferentes efectores: hormonas y factores de crecimiento, receptores de membrana citoplasmática y nucleares (por ejemplo: estrógeno, progesterona, glucocorticoides, vitamina D y receptores tiroideos), etc. Los múltiples pasos de la transducción de señales son potenciales sitios blanco para la quimioprevención, en el restablecimiento de los controles celulares normales. Por ejemplo, el factor de crecimiento transformante β (TGF- β) posee actividad antiproliferativa en células normales y neoplásicas, mientras que el factor de crecimiento tipo insulina

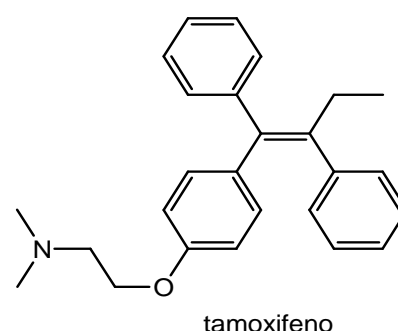


Figura 1.8. Estructura de tamoxifeno

²³ Nzeako, U. C.; Guicciardi, M. E.; Yoon, J. H.; Bronk, S. F.; Gores, G. J. COX-2 inhibits Fas-mediated apoptosis in cholangiocarcinoma cells. *Hepatology*. 2002; 35: 552-559.

1 (IGF-1) estimula la replicación celular en varios tumores.¹⁹

Los estudios de quimioprevención del cáncer de mama involucran el uso de moduladores selectivos de receptores de estrógenos en pacientes con riesgo elevado de padecer este tipo de cáncer. Un agente de este tipo, el tamoxifeno (figura 1.8), previene el desarrollo de segundos tumores primarios (SPTs) y de cáncer de mama *de novo* en pacientes de alto riesgo. Se observó una reducción del 49% en la incidencia de cáncer de mama invasivo en mujeres tratadas con tamoxifeno con tumores positivos para el receptor de estrógenos (ER+), pero no en tumores ER-.²¹

- *Inhibición del metabolismo de las poliaminas.*

Las poliaminas son cationes orgánicos derivados de aminoácidos, altos niveles de poliaminas se asocian con un incremento en la proliferación celular, un decremento en la apoptosis y un incremento en la expresión de genes que afectan la invasión tumoral y metástasis. Las poliaminas son necesarias para el desarrollo de vasos sanguíneos (angiogénesis) que ocurre durante el crecimiento del tumor. Se ha descrito que la inhibición de la síntesis de poliaminas bloquea la angiogénesis en modelos tumorales.²⁴

Un paso crítico en el metabolismo de las poliaminas es la decarboxilación de la ornitina, catalizada por la ornitina decarboxilasa (ODC) para dar putrescina. Agentes químicos que inhiben la inducción de ODC poseen potencial quimiopreventivo. Difluorometilornitina (DFMO) es un inhibidor específico e irreversible de la ODC.²⁵

- *Restauración de la respuesta inmune.*

Se han publicado numerosos trabajos respecto a la importancia y utilidad de los anticuerpos contra los productos de los oncogenes o las oncoproteínas. La prostaglandina E2 es conocida por su capacidad de suprimir la respuesta inmune en ciertas células tumorales, por lo que inhibidores de la ciclooxigenasa disminuyen esta supresión inmune. Los retinoides quimiopreventivos trabajan como inmuno-estimulantes. De hecho, el ácido retinoico potencia la citotoxicidad mediada por células y de las células asesinas naturales. También se han descrito efectos inmunoestimulativos del selenio y del α -tocoferol, lo cual explicaría en parte su acción como agentes quimiopreventivos.¹⁹

²⁴ Takahashi, Y.; Mai, M. and Nishioka, K. α -Difluoromethylornithine induces apoptosis as well as anti-angiogenesis in the inhibition of tumor growth and metastasis in a human gastric cancer model. *Int. J. Cancer*, 2000; 85: 243-247.

²⁵ Gerner, E. W.; Meyskens, F. L. Poliamines and cancer: old molecules, new understanding. *Nature Rev. Cancer*. 2004; 4: 781-792.

LA VÍA DE REGULACIÓN Keap1-Nrf2

El Elemento ARE, el Factor Nrf2 y el Represor Keap1

Para mantener un balance favorable entre la bioactivación y la detoxificación de potenciales compuestos dañinos para las células, estas poseen un sistema de defensa citoprotector inducible que se conoce como la vía de respuesta a antioxidantes. La activación de esta vía lleva a la inducción de la expresión de un panel de genes que codifican para enzimas detoxificantes y antioxidantes de fase II y su regulación está dada principalmente por tres componentes: 1) el elemento de respuesta a antioxidantes, ARE, un motivo de unión al ADN que se encuentra en los promotores de varios genes codificantes de enzimas citoprotectoras; 2) el factor de transcripción Nrf2 (*NF-E2 related factors*), de unión al motivo ARE; y 3) el represor citosólico de Nrf2, Keap1 (*Kelch-like ECH-associated protein 1*).²⁶

El elemento ARE (*antioxidant response element*), también conocido como elemento de respuesta a electrófilos (EpRE), fue caracterizado inicialmente en 1990 cuando se localizó en la región 5' flanqueante del gen que codifica para GST Ya de rata y se determinó su capacidad de respuesta frente a compuestos fenólicos antioxidantes como la *tert*-butilhidroquinona (*t*-BHQ).²⁷ La secuencia consenso del elemento ARE, 5'-TGA(G/C)NNNGC -3' fue hallada posteriormente en la región 5' reguladora de otros genes codificantes de enzimas de fase II. En estudios subsiguientes se encontraron múltiples proteínas capaces de unirse al elemento ARE, además del factor Nrf2 y los factores Maf que se verá más adelante, otros factores de transcripción han sido implicados en la regulación de la expresión de los genes ARE dependientes, entre los que se encuentran los factores Nrf1, Nrf3, Bach1 y Bach3 de la familia CNC (*Cap 'n ' Collar*); proteínas de la superfamilia de factores de transcripción AP-1 como ATF1-4, JunD, c-Jun y c-Fos; y los receptores nucleares RARa, PPARc, Era y ERRb.²⁸

Nrf2 es un factor de transcripción de 605 aminoácidos perteneciente a la familia CNC que se expresa en varios tejidos, particularmente aquellos asociados a la detoxificación (hígado y riñón) o expuestos al medio externo (piel, pulmones y tracto digestivo). En general, se ha observado que ratones modificados genéticamente que carecen de un gen funcional de Nrf2 son más sensibles a la carcinogénesis química. La actividad quimiopreventiva de varias clases de compuestos inductores de enzimas detoxificantes, como los antioxidantes fenólicos, las ditioltionas y los isotiocianatos, se pierde en los ratones que carecen de una vía funcional Keap1-Nrf2.

²⁶ Copple, I. M.; Goldring, C. E.; Kitteringham, N. R.; Park, B. K. The Keap1-Nrf2 cellular defense pathway: mechanisms of regulation and role in protection against drug-induced toxicity. *Adverse Drug Reactions, Handbook of Experimental pharmacology* 196, Ed. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 2010: 233-266.

²⁷ Rushmore, T. H.; Pickett, C. B. Transcriptional regulation of the rat glutathione S-transferase Ya subunit gene. Characterization of a xenobiotic-responsive element controlling inducible expression by phenolic antioxidants. *J. Biol. Chem.*, 1990, 265(24): 14648-14653.

²⁸ Baird, L.; Dinkova-Kostova, A. T. The cytoprotective role of the Keap1-Nrf2 pathway. *Arch. Toxicol.*, 2011, 85:241-272.

Nrf2 contiene 6 dominios funcionales denominados Neh1-6 (*Nrf2-ECH homology*) (figura 1.9 A). El dominio Neh1 contiene un motivo básico de unión al ADN tipo cremallera de leucinas (bZip) que facilita la dimerización con otros factores bZip y la unión al ADN. Nrf2 requiere de la formación de heterodímeros con proteínas Maf: MafF, MafG o MafK (también factores de transcripción con dominios bZip) para unirse con alta afinidad al ADN y activar la transcripción génica.²⁶ Mediante deleciones se identificó al dominio Neh2 como regulador negativo, siendo responsable de la unión a Keap1. Los dominios Neh3-5 se unen a factores coactivadores de la transcripción, CHD6 y CBP, para inducir la expresión de los genes dependientes del ARE.²⁸ En experimentos con ratones *knock out* para el gen *nrf2* se observó que la carencia de este gen elimina significativamente la expresión de GST y NQO1 inducida por el antioxidante fenólico *tert*-butilhidroxianisol (*t*-BHA), constituyendo la primer evidencia *in vivo* que Nrf2 es un factor de transcripción crítico en la regulación de los genes de fase II mediada por ARE.²⁹

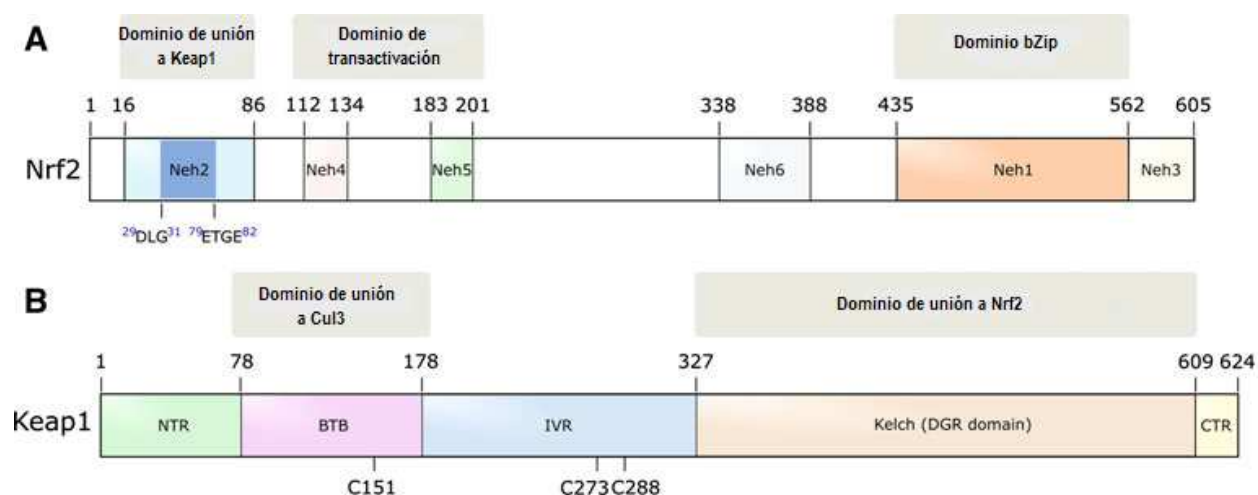


Figura 1.9. Esquema de los dominios estructurales del factor de transcripción Nrf2 (A) y del represor Keap1 (B). En (A) se encuentran dentro del dominio Neh2 de Nrf1 los motivos DLG y ETGE a través de los cuáles se une a Keap1. El dominio Neh1 contiene el motivo de unión al ADN y heterodimerización bZip mediante el cual Nrf2 interacciona con las Mafs para unirse al ADN. Los dominios Neh4 y Neh5 tienen función transactivadora mediante su interacción con factores co-transcripcionales. En (B) se indican la región *N*-terminal (NTR), el dominio BTB, la región *intervening* (IVR), el dominio Kelch (DGR) y la región *C*-teminal (CTR) de Keap1, así como la ubicación de las cisteínas 151, 273 y 288. Keap1 se une a Cullin 3 y dimeriza a través del dominio BTB, mientras el dominio Kelch media la unión a Nrf2. Adaptado de ²⁸

Por otra parte, en ausencia de estrés celular se encontró que Nrf2 se encuentra secuestrado en el citoplasma por una proteína represora que impide su ingreso al núcleo; la misma se denominó Keap 1 (*Kelch-like ECH-associated protein 1*).³⁰ Keap1 es una proteína de 69 KDa que se ancla al citoesqueleto de actina. En ratón esta

²⁹ Kwak, M.; Wakabayashi, N; Kensler, T. W. Chemoprevention through the Keap1-Nrf2 pathway by phase 2 enzyme inducers. *Mut. Res.*, 2004, 555: 133-148.

³⁰ Hotzclaw, W. D.; Dinkova-Kostova, A. T.; Talalay, P. Protection against electrophile and oxidative stress by induction of phase 2 genes: the quest for the elusive sensor that responds to inducers. *Adv. Enz. Regul.* 2004, 44: 335-367.

proteína consta de 5 dominios: 1) NTR, región *N*-terminal; 2) un dominio BTB (*Broad complex*, *Tramtrack* y *Bric à brac*); 3) IVR (*intervening region*), la cual es muy rica en residuos cisteínas; 4) DGR, (*double glycine repeat*) también conocido como dominio Kelch y 5) CTR, región carboxilo terminal (figura 1.9B). El dominio BTB es un motivo conservado en proteínas de unión a la actina y en factores de transcripción con dedos de zinc que a menudo dimerizan. De hecho, se requiere la dimerización a través de los dominios BTB, para que Keap1 pueda secuestrar Nrf2 y así prevenir la transcripción de los genes de las enzimas de fase II.³¹ El dominio DGR contiene 6 repeticiones Kelch que son las responsables de la unión a Nrf2. La proteína Keap1 humana contiene veintisiete residuos de cisteína, de los cuáles diez se suponen reactivos debido a que se ubican adyacentes a aminoácidos cargados positivamente. Los aminoácidos básicos reducen el pKa de los grupos tioles de las cisteínas del entorno, estabilizando el anión tiolato y mantienen las cisteínas en estado reactivo. Dado que Keap1 actúa como regulador negativo de Nrf2 y contiene varias cisteínas reactivas, se sugirió su acción como sensor redox en la inducción mediada por diferentes compuestos. De hecho se determinó que distintas cisteínas actúan como sensores específicos para diferentes clases de inductores, por ejemplo la C151 que se encuentra en el dominio BTB de Keap1 responde al óxido nítrico, sulforafano y la *t*-BHQ, mientras la C288 se localiza en la región IVR y responde a alquenos.³² Si bien los compuestos inductores de esta vía son estructuralmente diversos, muchos son electrofílicos y tienen la capacidad de modificar grupos sulfhidrilos nucleofílicos mediante alquilación, oxidación o reducción.

Mecanismos Reguladores de la Vía Keap1-Nrf2

Inicialmente la restricción física impuesta por Keap1 sobre Nrf2 al impedir su translocación al núcleo era el mecanismo propuesto por el cual Keap1 ejerce su función represora. Investigaciones más recientes ponen en evidencia que la activación de Nrf2 ocurre mediante mecanismos más complejos que su simple liberación de Keap1. En el modelo más aceptado actualmente, denominado “Modelo de cierre y bisagra”, se determinó que en ausencia de estrés celular la vida media de Nrf2 es corta (10-30 minutos), por lo que sus niveles en los tejidos son bajos y se sugirió que el factor Nrf2 en estas condiciones estaba siendo rápidamente degradado por la vía del proteasoma. En este sentido, se encontró que Keap1 media la ubiquitinación de Nrf2 al funcionar como adaptador para un complejo E3 ubiquitín-ligasa dependiente de Cullin, denominado Cul3. Este último actúa como puente molecular aproximando el sustrato a ser ubiquitinado, en este caso Nrf2, el adaptador Keap1 y la proteína *ring-box* Roc1/Rbx1, encargada de reclutar el componente E2 del complejo de ubiquitinación. De esta forma Cul3 promueve la ubiquitinación y degradación de Nrf2 de manera dependiente de Keap1.²⁶ Así, en condiciones fisiológicas normales Nrf2 se encuentra secuestrado en el citoplasma y mantenido a niveles bajos a través de la ubiquitinación y degradación proteasomal dependiente de Keap1.

³¹ Lee, J.; Surh, Y. Nrf2 as a novel molecular target for chemoprevention. *Cancer Lett.*, 2005, 224: 171-184.

³² McMahon, M.; Lamont, D. J.; Beattie, K. A.; Hayes, J. D. Keap1 perceives stress via three sensors for the endogenous signaling molecules nitric oxide, zinc, and alkenals. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2010, 107:18838–18843.

Frente al estrés celular un grupo de cisteínas reactivas de Keap1 son modificadas y el cambio conformacional resultante en Keap1 libera a Nrf2 y evita su consecuente degradación. El modelo de cierre y bisagra (figura 1.10) propone que una molécula de Nrf2 se une a un dímero de Keap1 a través de dos sitios (DLG y ETGE) con diferente afinidad; frente al agente inductor, el cambio conformacional en Keap1 provocaría su disociación del sitio de baja afinidad (o cierre) mientras la interacción en el sitio de alta afinidad (o bisagra) permanece intacta.³³ En presencia de inductores del ARE, Nrf2 se encuentra unida a Keap1 a través del sitio de alta afinidad de manera que escapa la ubiquitinación y degradación, llevando a su acumulación en el citoplasma.

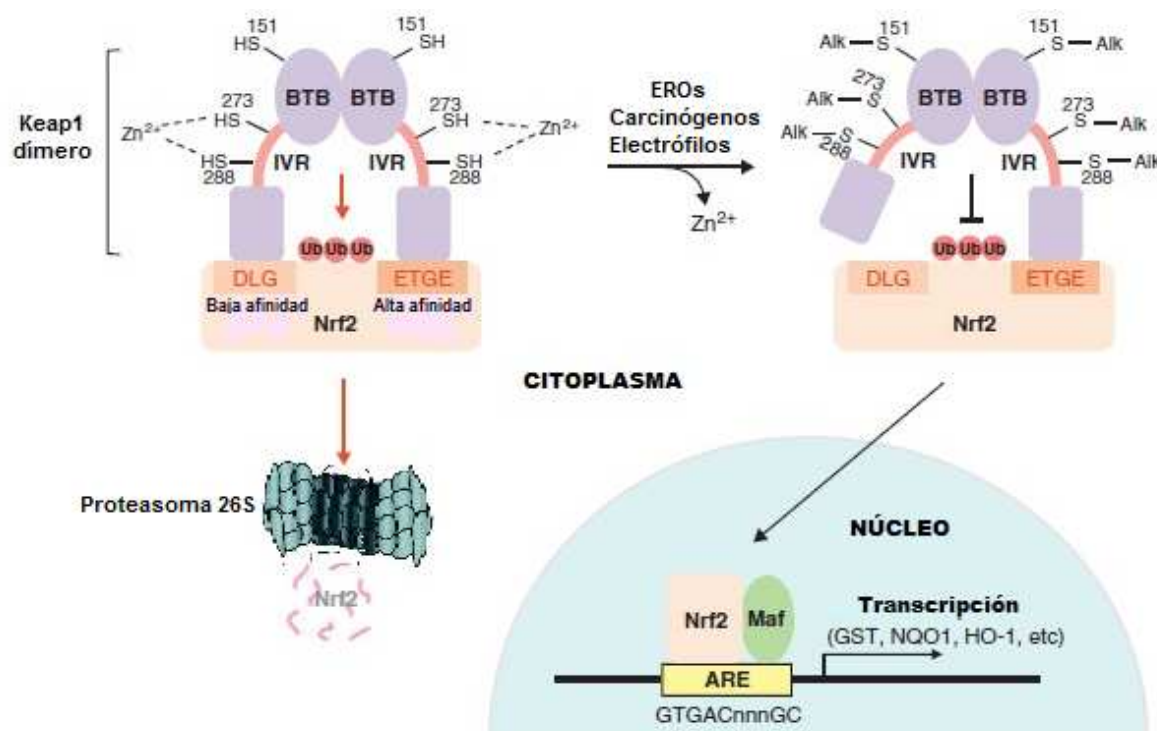


Figura 1.10. Mecanismo de activación de la vía Nrf2-ARE. Modelo de cierre y bisagra: el homodímero Keap1 reconoce los motivos DLG y ETGE en la proteína Nrf2, marcándola para su ubiquitinación por el complejo Cul3/Rbx1/E2 y degradación por el proteasoma 26S. Los inductores del ARE modifican residuos clave de cisteína de Keap1 (C151, 273 y 288) produciendo un cambio conformacional en Keap1 que hace que esta se suelte del dominio de cierre DLG (baja afinidad) de Nrf2. La unión a través del dominio bisagra ETGE (alta afinidad) permanece intacta, estabilizando Nrf2 al impedir su ubiquitinación, lo que favorece su acumulación y translocación al núcleo donde se une al elemento ARE y activa, junto a los factores Mafs, la expresión de genes citoprotectores. Adaptado de.³⁵

Eventualmente Nrf2 se acumula en niveles que superan la capacidad de secuestro de Keap1 y las moléculas excedentes se translocan al núcleo donde pueden unirse al elemento ARE junto a los factores Maf y activar la transcripción de genes citoprotectores. Los compuestos inductores inactivan la función de Keap1 modificando los residuos de cisteína mencionados anteriormente mediante oxidación o modificaciones covalentes. Las cisteínas

³³ Tong, K.I.; Katoh, Y.; Kusunoki, H.; Itoh, K.; Tanaka, T.; Yamamoto, M. Keap1 recruits Neh2 through binding to ETGE and DLG motifs: characterization of the two-site molecular recognition model. *Mol. Cell. Biol.*, 2006, 26:2887–2900.

273 y 288 coordinan un ion de Zn^{2+} y son importantes para preservar la integridad estructural de Keap1 que le permite asociarse a Nrf2. Se cree que la modificación de estas dos cisteínas libera el ion de Zn^{2+} provocando el cambio conformacional en Keap1, acompañado de su disociación de Cul3 y de la inhibición de la ubiquitinación de Nrf2 dependiente de Keap1.³⁴

Se ha encontrado también que la fosforilación tiene un papel importante en el mecanismo de acción de Nrf2, al observarse la atenuación de la inducción de Nrf2 mediante el uso de inhibidores específicos de proteínas quinasas. Por ejemplo, la fosforilación de Nrf2 en la tirosina 568 por la tirosina quinasa Fyn se requiere para su exportación al núcleo. La actividad de ésta y otras quinasas como la PKC, ERK y las MAPKs regularían la estabilidad y localización de Nrf2 a través de fosforilación dependiente del tipo celular.³⁵ Además, se encontró que Nrf2 puede ser regulada también a nivel traduccional, el mecanismo parece involucrar un sitio interno de entrada al ribosoma (*IRES*) localizado en la región 5' no traducida del ARNm de Nrf2 que media la traducción del factor en respuesta al estrés de manera redox-dependiente.³⁶

Recientemente, varios hallazgos apuntan a una diversificación del rol de Nrf2, sugiriendo que este factor puede ejercer su función citoprotectora mediante otros mecanismos además de la detoxificación de xenobióticos y tóxicos celulares. En este sentido se ha descrito la interacción de Nrf2 con otras vías de señalización intracelular, como el factor Notch1 (vía promotora del crecimiento y la diferenciación celular), donde Nrf2 se encontró parcialmente responsable de la expresión de Notch1 en ratones adultos. Por tanto, el rol de Nrf2 va más allá de su papel inmediato en la detoxificación de las células, contribuyendo también al proceso de recuperación de los tejidos dañados. Otros ejemplos que apoyan este escenario son la interacción de Nrf2 con la proteína p62 mediadora de autofagia, la vía p21/p53 que participa en la reparación del daño al ADN y la muerte celular programada, y la vía de señalización pro-inflamatoria NF- κ B.³⁷ La ausencia o inhibición de Nrf2 provoca un aumento de la expresión/ actividad de mediadores inflamatorios como la COX-2, iNOS y TNF α , cuya activación transcripcional está regulada vía NF- κ B. Este factor es reconocido como un nexo importante entre la inflamación y el cáncer. Dada la interacción reportada con Nrf2, se postula que su acción supresora de respuestas inflamatorias estaría dada por la inhibición (directa o indirecta) de la expresión del factor NF- κ B, cumpliendo un rol protector frente a la carcinogénesis asociada a los procesos inflamatorios.³⁸

³⁴ Kensler, T. W.; Wakabayashi, N. Nrf2: friend or foe for chemoprevention? *Carcinogenesis*, 2010, 31(1): 90–99.

³⁵ Hur, W.; Gray, N. S. Small molecule modulators of antioxidant response pathway. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2011, 15:162-173.

³⁶ Li, W.; Thakor, N.; Xu, E. Y.; Huang, Y.; Chen, C.; Yu, R.; Holcik, M.; Kong, A. N. An internal ribosomal entry site mediates redox-sensitive translation of Nrf2. *Nucleic Acids Res.*, 2010, 38:778-788.

³⁷ Slocum, S. L.; Kensler, T. W. Nrf2: control of sensitivity to carcinogens. *Arch. Toxicol.*, 2011, 85:273–284.

³⁸ Kundu, J. K.; Surh, Y.-J. Nrf2-Keap1 Signaling as a Potential Target for Chemoprevention of Inflammation-Associated Carcinogenesis. *Pharm. Res.*, 2010, 27:999–1013.

Vía Keap1-Nrf2 en la Protección frente a Xenobióticos: Inductores Monofuncionales y Bifuncionales

Se ha demostrado la existencia de distintas vías intracelulares de transducción de señales que están implicadas en las señales químicas que median la translocación nuclear de Nrf2 y la activación transcripcional de los genes regulados por el elemento ARE. Además de permitir la translocación de Nrf2 hacia el núcleo, los agentes inductores contribuyen a aumentar la disponibilidad de enzimas de fase II mediante otros mecanismos.

En 1967 Williams sugirió que las reacciones que involucran el metabolismo de xenobióticos pueden ser divididas en dos pasos (citado en ³⁰). Las de **Fase I** involucran oxidaciones, reducciones y reacciones de hidrólisis que dan como resultado la adición de grupos funcionales a los xenobióticos y son catalizadas por la superfamilia de citocromos P450. La **Fase II** consiste en la conjugación llevada a cabo por transferasas, de ligados endógenos como glutatión y ácido glucurónico a los productos de fase I de forma de hacerlos más solubles y por tanto fácilmente excretables, convirtiéndolos a menudo en metabolitos menos tóxicos. Dado que las enzimas de fase I pueden también convertir procarcinógenos en carcinógenos, el incremento de la actividad de enzimas de fase II, después de la administración de agentes inductores, detoxificaría y eliminaría estos metabolitos tóxicos, reduciendo la incidencia de la carcinogénesis.

La región 5' del gen de citocromo P450 1A1, perteneciente a la familia de enzimas de metabolización de xenobióticos de fase I, contiene en su promotor una secuencia XRE (elemento de respuesta a xenobióticos), que también ha sido encontrada corriente arriba de genes que codifican enzimas de fase II como GST y NQO humanos y en otros genes relacionados. Existen dos proteínas reguladoras que median la inducción a través del elemento XRE, el receptor de hidrocarburos aromáticos, Ah (*aryl hydrocarbon*) y una proteína translocadora que interviene en el transporte del receptor Ah unido a su ligando (inductor) hacia el núcleo, la misma se denomina Arnt (*Ah receptor nuclear translocator*).^{39 40}

La existencia de esta vía de regulación y diversos experimentos llevaron a la necesidad de distinguir dos tipos de inductores:

- Inductores bifuncionales
- Inductores monofuncionales

Los inductores **bifuncionales** como PAH, TCDD (2,3,7,8-tetraclorodibenzo-*p*-dioxina), β NF, colorantes azo y otros compuestos planares aromáticos, los cuales dependen del receptor Ah, incrementan la actividad tanto de las enzimas de fase I como de fase II. En contraste, los inductores **monofuncionales** como antioxidantes

³⁹ . Whitlock Jr, J. P. Induction of cytochrome P4501A1. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. ,1999, 39:103-125.

⁴⁰ Nioi, P.; Hayes, J. D. Contribution of NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 to protection against carcinogenesis, and regulation of its gene by the Nrf2 basic-region leucine zipper and the arylhydrocarbon receptor basic helix-loop-helix transcription factors. Mut. Res., 2004, 555(1-2):149-171.

fenólicos (BHA, BHT), aceptores de Michael, 1,2-ditio-3-tionas, isotiocianatos, entre otros, inducen selectivamente genes de fase II pero no de fase I, y no requieren la participación del receptor Ah, actuando principalmente a través de la vía Keap1/Nrf2 (ver figura 1.11).³⁰

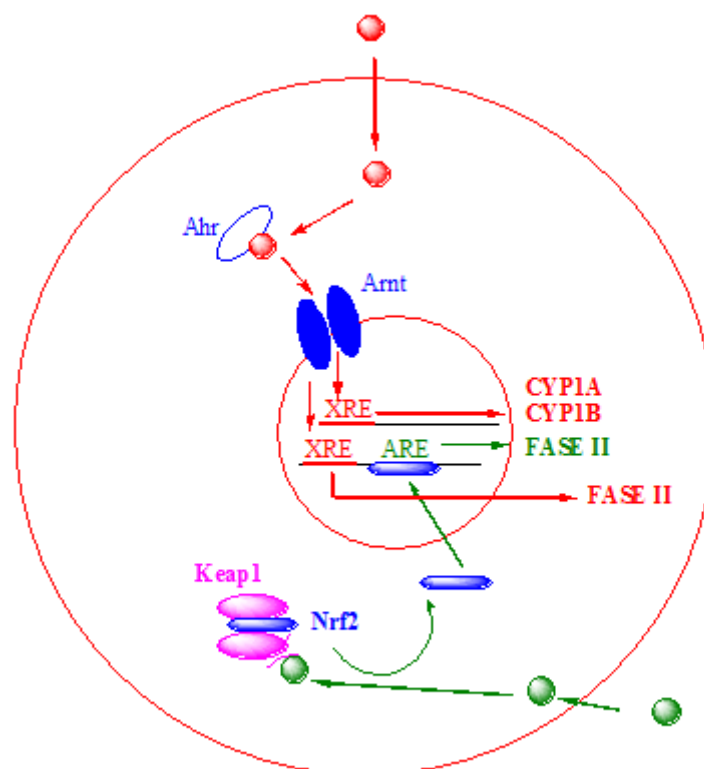


Figura 1.11. Inducción de enzimas de fase I y II por inductores monofuncionales y bifuncionales. Los inductores monofuncionales (en verde) entran a la célula y reaccionan con los grupos sulfhidrilos de Keap1, que actúa como “sensor” transmitiendo las señales inductoras (Nrf2) para activar la transcripción de los genes de fase II a través de la secuencia ARE. Los inductores bifuncionales (en rojo) pueden actuar por dos mecanismos diferentes: a) Unirse directamente al receptor de Ah (Ahr) en el citoplasma, con la subsecuente translocación del complejo al núcleo y unión al elemento XRE de los genes de fase I para activar su transcripción. b) Además de las secuencia ARE, algunos genes de fase II también contienen la secuencia XRE funcional y por tanto pueden ser activados por este complejo.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Diseño, síntesis y elucidación estructural de nuevos análogos de flavonoides, en particular chalconas, y búsqueda de nuevas entidades farmacofóricas como posibles inductores monofuncionales de enzimas de detoxificación de xenobióticos de fase II, potencial mecanismo quimiopreventivo para el cáncer.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Diseño, síntesis y elucidación estructural de tres series de nuevos análogos de chalcona en base a los antecedentes descritos.
2. Búsqueda de nuevas entidades farmacofóricas con actividad inductora de enzimas de fase II utilizando una quimioteca propia siguiendo los criterios de selección enumerados en resultados.
3. Evaluación de la modulación de la actividad de las enzimas QR, GST y CYPs con actividad EROD por los compuestos planteados en 1. y 2.: optimización de un método de tamizaje *in vitro* basado en un modelo celular.
4. Determinación de índice de quimioprevención IC (IC_{50}/CD) para aquellos compuestos que exhiban actividad inductora monofuncional de enzimas de fase II.
5. Estudio de la activación de la vía Nrf-2-ARE por aquellos compuestos que demuestren ser buenos inductores monofuncionales en el modelo celular, evaluando la translocación de Nrf-2 al núcleo mediante inmunocitoquímica.
6. Determinación de actividad citotóxica *per se* de los análogos de flavonoides frente a líneas celulares tumorales, MCF7, TK10 y HT-29.
7. Estudios de mutagenicidad y daño al ADN: test de Ames y ensayo del cometa de compuestos seleccionados.
8. Evaluación de la modulación de la actividad de las enzimas QR, GST y CYPs con actividad EROD *in vivo* por aquellos compuestos que muestren los mejores perfiles farmacológicos considerando todas las actividades biológicas ensayadas.

ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN

ANTECEDENTES PROPIOS EN EL TEMA

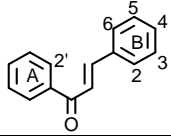


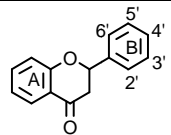
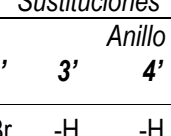
En el marco del trabajo de final de carrera de la Licenciatura en Bioquímica (Facultad de Ciencias)⁴¹ se sintetizaron y evaluaron en cuanto a su capacidad inductora y toxicidad, nuevos compuestos de la familia de los flavonoides que podrían actuar como agentes quimiopreventivos para el cáncer. Se estudiaron chalconas, flavonas y flavanonas con diferentes sustituyentes en posición 2, 3, 4, 5 o 2', 4' o ambas, abarcando un amplio rango de propiedades fisicoquímicas (ver tabla 2.1). Se estudió el efecto de la administración intragástrica de estos compuestos a ratas Sprague Dawley sobre la actividad de las enzimas GST, QR y CYP (actividad EROD) hepáticas. De los catorce compuestos evaluados (**A1** - **A14**), tres chalconas mostraron una inducción enzimática de QR importante con respecto al control, éstas son las chalconas **A2**, **A3** y **A6**. De las ocho chalconas evaluadas como inductoras de GST, cinco presentaron una leve inducción, siendo **A1** la que mostró mayor actividad. Respecto a la actividad CYP1, que en principio sería deseable que no aumentase, los compuestos **A4** y **A7** entran dentro de esta categoría.

Por otra parte, se analizó además la actividad antitumoral en un ensayo *in vitro* frente a dos líneas celulares diferentes MCF-7 (derivada de adenocarcinoma de mama receptor de éstrogeno positiva) y TK-10 (derivada de carcinoma renal). Se observa cierta selectividad citotóxica de los compuestos frente a las líneas celulares tumorales, así los compuestos **A4**, **A6**, **A7**, **A8** y **A11** poseen mayor citotoxicidad frente a la línea TK-10, siendo la chalcona **A8** la que muestra la mayor diferencia en el porcentaje de supervivencia de las dos líneas. **A1**, **A3**, **A5** y **A10**, resultan ser muy citotóxicos en ambas líneas celulares tumorales evaluadas (ver figura 2.1). Así, en estudios posteriores se determinó el IC₅₀ para estos derivados que resultaron interesantes y se ensayó además la actividad citotóxica frente a la línea HT-29 (derivada de adenocarcinoma de colón), los resultados se presentan en tabla 2.2.⁴²

⁴¹ Cabrera, M. Evaluación de la modulación de enzimas detoxificantes de xenobióticos por análogos sintéticos de flavonoides naturales: potenciales agentes quimiopreventivos para el cáncer. *Trabajo especial II*, Licenciatura en Bioquímica, Facultad de Ciencias, UdelaR., Montevideo, Uruguay. 2006

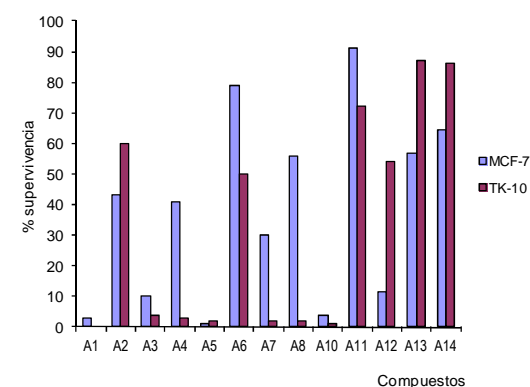
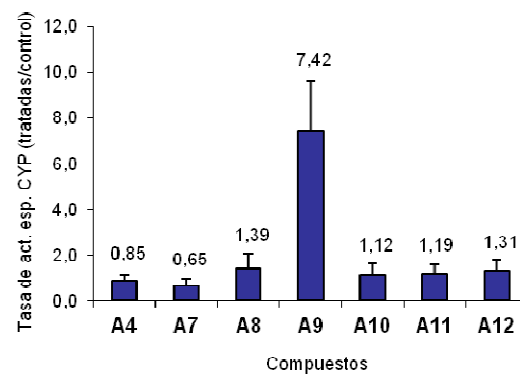
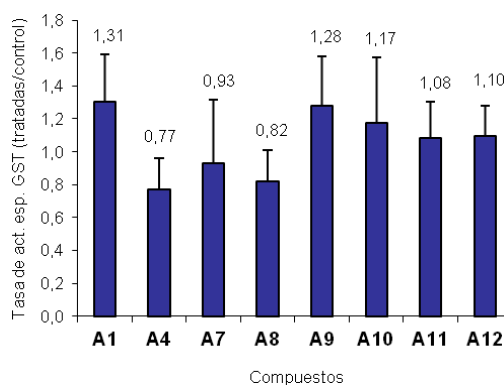
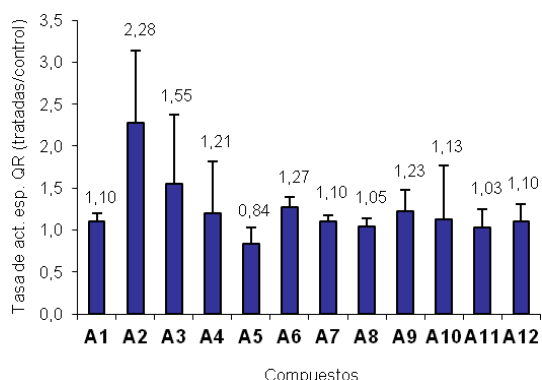
⁴² Cabrera, M.; Simoens, M.; Falchi, G.; Lavaggi, M.L.; Piro, O.E.; Castellano, E.E.; Vidal, A.; Azqueta, A.; Monge, A.; López de Ceráin, A.; Sagra, G.; Seoane, G.; Cerecetto, H.; González, M. Synthetic chalcones, flavanones, and flavones as antitumor agents: biological evaluation and structure-activity relationships. *Bioorg. Med. Chem.* 2007, 15: 3356-3367.

Tabla 2.1. Estructura de los flavonoides **A1-A14** evaluados por nuestro grupo como primer antecedente¹ y de **A15** y **A16** en estudios posteriores.^a

CHALCONAS						
						
Sustituciones						
Compuesto	Anillo A 2'	2	3	Anillo B 4	5	6
A1	-OH	-H	-H	-H	-H	-H
A2	-OH	-H	-H	-Br	-H	-H
A3	-OH	-H	-H	-OMe	-H	-H
A4	-OH	-H	-H	-Cl	-H	-H
A5	-OH	-H	-	-OMe	-H	-H
OMe						
A6	-OH	-H	-OCH ₂ O-	-H	-H	-H
A7	-H	-H	-H	-OMe	-H	-H
A8	-H	-H	-H	-Cl	-H	-H
A9	-H	-H	-H	-SMe	-H	-H
A10	-OH					
A11	-OH					
FLAVANONA						
						
Sustituciones						
Compuesto	Anillo A* 2'	3'	Anillo B 4'	5'	6'	
A12	s/s	-Br	-H	-H	-H	-H
A15 ^a	s/s	-H	-H	-OMe	-H	-H
FLAVONAS						
						
Sustituciones						
Compuesto	Anillo A* 2'	3'	Anillo B 4'	5'	6'	
A13	s/s	-H	-H	-H	-H	-H
A14	s/s	-H	-H	-Br	-H	-H
A16 ^a	s/s	-Br	-H	-H	-H	-H

* s/s: sin sustituyente. ^a Ref. ^{42, 43}

Figura 2.1. Modulación *in vivo* de actividad QR, GST y CYP hepáticas y actividad antitumoral de los compuestos mostrados en tabla 2.1



En otros estudios del grupo⁴³, de forma de conocer el potencial uso de los flavonoides como agentes quimiopreventivos para el cáncer, se desarrolló un modelo *in vivo* de tumorigénesis inducido químicamente por *N*-metilnitrosourea (NMU)⁴⁴. En este ensayo, se evaluó la potencial capacidad quimiopreventiva de los flavonoides estudiados, chalconas **A1**, **A2**, **A3**, flavonas **A14** y **A16**, y flavanona **A15** (ver estructura en tabla 2.1), así como también sus efectos tóxicos. El esquema de administración oral involucró dosis diaria de 10.0 mg/kg/día previo a la inyección de carcinógeno NMU. En este experimento se observaron tres diferencias importantes entre los animales tratados con **A1**, **A2**, **A3** y los animales no tratados: tiempo de aparición del primer tumor, el peso de los tumores disecados y la incidencia de los tumores observables (ver figura 2.2). Las flavonas y flavanonas exhibieron efectos menos relevantes (datos no mostrados). Ninguno de los flavonoides estudiados mostró efectos tóxicos relevantes cuando se analizaba, peso corporal, parámetros bioquímicos y estudios histopatológicos de los órganos (datos no mostrados).⁴³

Tabla 2.2. IC₅₀ sobre la líneas tumorales TK-10, MCF7 y HT-29 de las chalconas más interesantes.

Compuesto	IC ₅₀ ^a (μM)		
	TK-10	MCF-7	HT-29
A1	79.0	78.0	85.0
A3	67.0	ND ^b	ND ^b
A5	90.1	95.0	ND ^b
A10	12.2	6.7	13.8

^a IC₅₀: concentración que produce 50 % de citotoxicidad. ^b ND: no determinado.

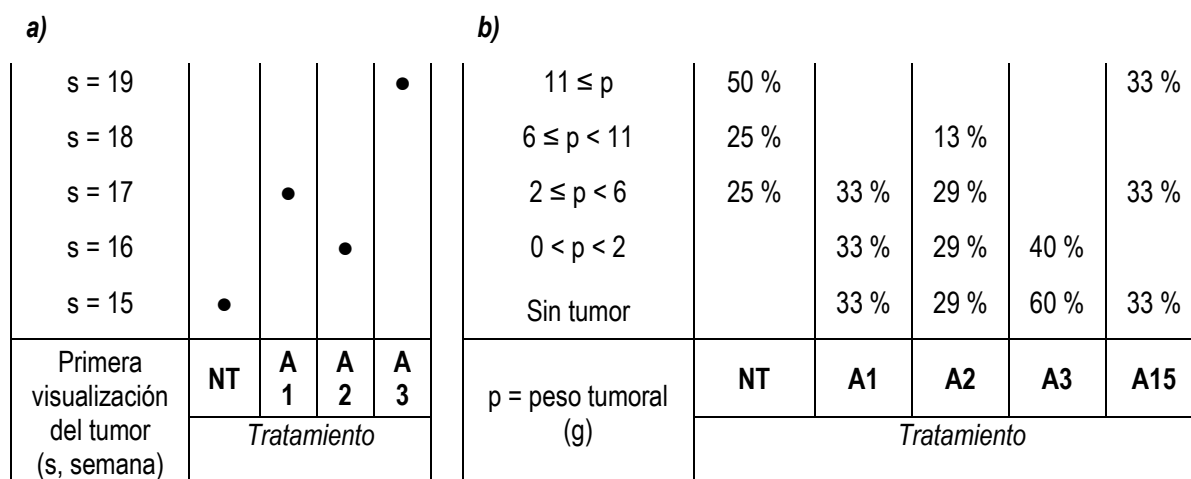


Figura 2.2. **a)** Semanas de visualización del primer tumor en los animales control (no tratados, **NT**) y aquellos que recibieron **A1**, **A3** o **A2**. **b)** Diagrama de dispersión de los pesos de los tumores disecados. Se indica el porcentaje (%) de animales dentro de cada rango de masa tumoral indicado, al final de los ensayos en los animales control (**NT**) y aquellos tratados con **A1**, **A2**, **A3** o **A15**. Los resultados en los animales no tratados son de diferentes experimentos.⁴³

⁴³ Cabrera, M.; Lavaggi, M.L.; Croce, F.; Celano, L.; Thomson, L.; Fernández, M.; Pintos, C.; Raymondo, S.; Bollati, M.; Monge, A.; López de Ceráin, A.; Piro, O.E.; Cerecetto, H.; González, M. Identification of chalcones as *in vivo* liver monofunctional phase II enzymes inducers. *Bioorg. Med. Chem.* 2010, 18: 5391-5399.

⁴⁴ Pérez-López, F.R. *N*-nitrosomethylurea-induced mammary tumors in Wistar rats: influence of prolactin suppression and stimulation on tumor growth in intact and castrated rats. *Exp. Clin. Endocrinol.* 1988, 7: 125-127.

De forma de evaluar la potencial toxicidad de esta familia de flavonoides sintéticos se realizaron estudios *in vitro* de mutagenicidad, mediante test de Ames (tabla 2.3), y daño al ADN, mediante ensayo del cometa (tabla 2.4), de aquellos derivados que resultaron más interesantes. De los compuestos evaluados, ninguno resultó ser mutagénico. A su vez se comprobó mediante el ensayo del cometa que tampoco causan daño significativo al ADN, con excepción del derivado **A10** que provoca rupturas leves. Cabe destacar que el ensayo del cometa fue realizado sobre células HK-2 (células epiteliales renales, no tumorales), ya que se había observado citotoxicidad selectiva frente a línea renal tumoral TK-10 (ver figura 2.1).⁴³ En ambos estudios de genotoxicidad se incluyen los compuestos **A10** y **A11** de forma de evaluar la influencia de diferentes heterociclos a modo de anillo B de las chalconas. Por otra parte, durante el seguimiento por 150 días, llevado a cabo en los estudios de quimioprevención *in vivo*⁴³ del peso corporal, parámetros bioquímicos y observación histopatológica luego del sacrificio no se evidenciaron signos de efectos tóxicos en el diagrama de administración empleado.

Tabla 2.3. Test de Ames, se indica el número de colonias revertientes His⁻ de *S. typhimurium* TA98 para los compuestos **A1**, **A10**, **A11**.⁴³

Compuesto	Dosis (µg/placa)	NR ^a ± DE
A1	225	14 ± 2
	75	20 ± 6
	25	17 ± 5
	8	17 ± 5
	3	13 ± 1
A10	45	18 ± 4
	15	17 ± 1
	5	16 ± 1
	2	17 ± 3
	1	13 ± 3
A11	115	14 ± 6
	38	13 ± 1
	13	19 ± 4
	4	16 ± 1
	1	15 ± 0
DMSO^b	0	21 ± 4
NPD^c	20	1434 ± 139

^a NR: número de revertientes promedio (n=2) ± desviación estándar (DE).

^b DMSO: control negativo (C-)

^c NPD: 4-nitro-o-fenilendiamina (control positivo).

NOTA: Un compuesto se considera mutagénico se supera en al menos 2 veces el NR respecto al (C-) y produce un efecto dosis respuesta.

Tabla 2.4. Electroforesis alcalina en gel de células individuales HK-2 (ensayo del cometa). Se indica el daño al ADN, en unidades arbitrarias, producido por los compuesto **A1-A3** y **A10**.^a

Compuesto	Número de cometas en cada categoría					UA ^b
	0	1	2	3	4	
A1	53	42	2	2	1	56
A2	58	38	1	3	0	49
A3	53	42	2	2	1	56
A10	13	64	13	6	4	124
A11	22	71	8	1	0	89
C (-) ^c	47	50	1	1	1	59
C(+) ^d	0	2	1	61	36	331

^a Los compuestos fueron ensayados a 20 μM . ^b UA: unidades arbitrarias de daño, 100 núcleos por microgel fueron clasificados en cometas de 0-4 según su intensidad de fluorescencia en la cabeza y en la cola, $0 \leq \text{UA} \leq 400$. ^c C(-): DMSO, control negativo. ^d C(+): las células HK-2 fueron tratadas con H_2O_2 50 μM , sobre hielo, durante 15 min, control positivo.

Actualmente existen diversas aproximaciones que predicen parcialmente las propiedades *druglikeness* (DL) asociadas a una molécula. Este término es un concepto cualitativo que hace referencia a factores que influyen por ejemplo la biodisponibilidad de un fármaco ideal. Se podría traducir como “propiedades tipo fármaco” y son estimadas a partir de descriptores topológicos o a partir de otras propiedades como PM, clogP, entre otras. El software *Osiris Property Explorer*®⁴⁵ determina la frecuencia de aparición de cada fragmento estructural de un compuesto dado dentro de la colección de fármacos comercializados y dentro de la colección de compuestos Fluka con efectos adversos (no fármacos). Valores positivos señalan que la molécula contiene predominantemente los fragmentos que frecuentemente se encuentran en medicamentos comerciales. Basándose en el mismo principio, el software, predice el riesgo de toxicidad de un compuesto y puede asignar a cada estructura un *drug score* (DS) que combina DL, clogP, log S, PM y el riesgo de toxicidad (ver tabla 2.5).

⁴⁵ Sander, T. *Osiris Property Explorer*, Actelion Pharmaceuticals Ltd., Gewerbestrasse 16, 4123 Allschwil, Suiza, <http://www.organic-chemistry.org/prog/peol/>.

Tabla 2.5. "Propiedades tipo fármaco" (del inglés *druglikeness*) de los derivados **A1-A3**, **A10**, **A14** y **A15** predichas *in silico* mediante el uso del software *Osiris Property Explorer*® 42, 45.

Compuesto	Riesgo de toxicidad ^a				DL ^f	DE ^g
	M ^b	C ^c	I ^d	R ^e		
A1	(+)	(+)	(+)	(+)	-2.65	0.44
A2	(+)	(+)	(+)	(+)	-1.38	0.41
A3	(+)	(+)	(+)	(+)	0.94	0.71
A10	(+)	(+)	(+)	(+)	0.82	0.77
A14	(+)	(+)	(+)	(+)	-2.05	0.36
A15	(+)	(+)	(+)	(+)	-0.19	0.59

^a Clasificado de acuerdo a: (+) sin efectos adversos, (±) efectos adversos medios, (-) efectos adversos. ^b M: efecto mutagénico, ^c T: efecto cancerígeno, ^d I: efecto irritante, ^e R: efecto reproductivo. ^f DL: druglikeness, ^g DS: drugscore.

De forma de predecir *in silico* el potencial global para calificar para fármaco de los derivados de flavonoides más interesantes se utilizó el software *Osiris Property Explorer*®, los resultados se presentan en tabla 2.5. Ninguno de los compuestos evaluados mostró riesgo de toxicidad. Cabe destacar que para los derivados **A1** y **A10** se ensayo la mutagenicidad *in vitro*, resultando ambos no mutagénicos (tabla 2.3), corroborando así lo predicho *in silico*. A su vez, el derivado **A10** mostró los mejores índices de DL y DS, convirtiéndolo en un buen candidato a fármaco.

Tabla 2.6. Resumen de todas las actividades biológicas ensayadas como antecedentes para los derivados **A1-A16**.

Compuesto	<i>Inducción de enzimas de fase II, in vivo.^a</i>	<i>Citotoxicidad frente a líneas celulares tumorales in vitro.^b</i>	<i>Actividad quimiopreventiva in vivo frente a la administración del carcinógeno NMU.^c</i>	<i>Test de Ames, estudios de mutagenicidad.^d</i>	<i>Ensayo del cometa, estudio de daño al ADN.^e</i>	<i>Predicción in silico de riesgo de toxicidad y drug score.^f</i>
A1	++	++	++	++	++	+
A2	++	-	++	ND ^g	++	+
A3	++	++	++	ND	++	++
A4	++	+	ND	ND	ND	ND
A5	-	++	ND	ND	ND	ND
A6	++	-	ND	ND	ND	ND
A7	+	+	ND	ND	ND	ND
A8	-	+	ND	ND	ND	ND
A9	++	+ ^h	ND	ND	ND	ND
A10	+	++	ND	++	+	++
A11	-	-	±	++	++	ND
A12	+	+	ND	ND	ND	ND
A13	- ⁱ	-	ND	ND	ND	ND
A14	++ ⁱ	-	++ ^j	ND	ND	+
A15	ND	++ ^h	+	ND	ND	++
A16	ND	+ ^h	± ⁱ	ND	ND	ND

^a) ++: ≥ 20 %, +: 10-20 %, -: ≤ 5 %. ^b) ++: % sup ≤ 10 % en dos líneas, +: % sup ≤ 40 % en una línea, -: % sup ≤ 40 % en dos líneas. ^c) ++: reducción en los tres factores que se enumeran, +: reducción en al menos un factor, ±: no se observan cambios respecto al control negativo (1. tiempo de aparición del primer tumor, 2. peso tumoral, 3. Incidencia). ^d) ++: NO mutagénico, -: mutagénico. ^e) ++: UA ≤ 100, +: UA ≤ 150, -: UA ≥ 200. ^f) ++: DS ≥ 0.5, +: 0 ≤ DS ≤ 0.5, -: DS ≤ 0.5. ^g) ND: no determinado. ^h) Ref. ⁴². ⁱ) Ref. ⁴³. ^j) Ref. ⁴⁶.

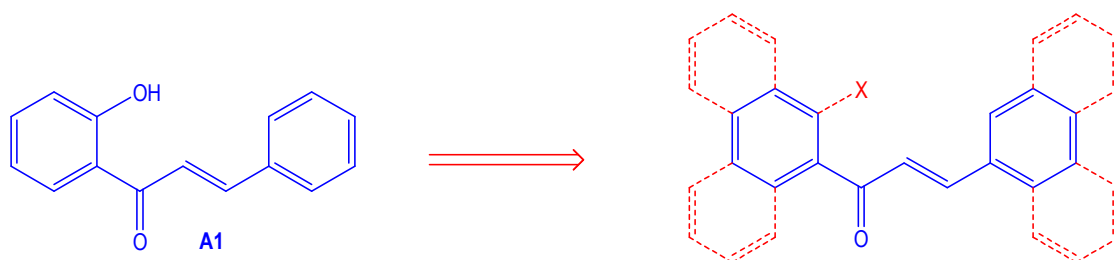
DESARROLLO Y PROPUESTA DE TRABAJO

Teniendo en cuenta lo descrito hasta el momento (resumido en tabla 2.6), en el presente proyecto de posgrado se propone realizar modificaciones estructurales de los flavonoides estudiados como se indica a continuación (a modo de esquema), con el fin de optimizar las actividades biológicas observadas. Así se diseñan la **SERIE I** y **II**.

⁴⁶ Song, L. L.; Kosmeder II, J. W.; Kook Lee, S.; Gerhäuser, C.; Lantvit, D.; Moon, R. C.; Moriarty, R. M.; Pezzuto, J. M. Cancer chemopreventive activity mediated by 4'-bromoflavone, a potent inducer of phase II detoxification enzymes. *Cancer Res.* 1999, 59: 573-585.

SERIE I

Productos Derivados de la Chalcona A1:

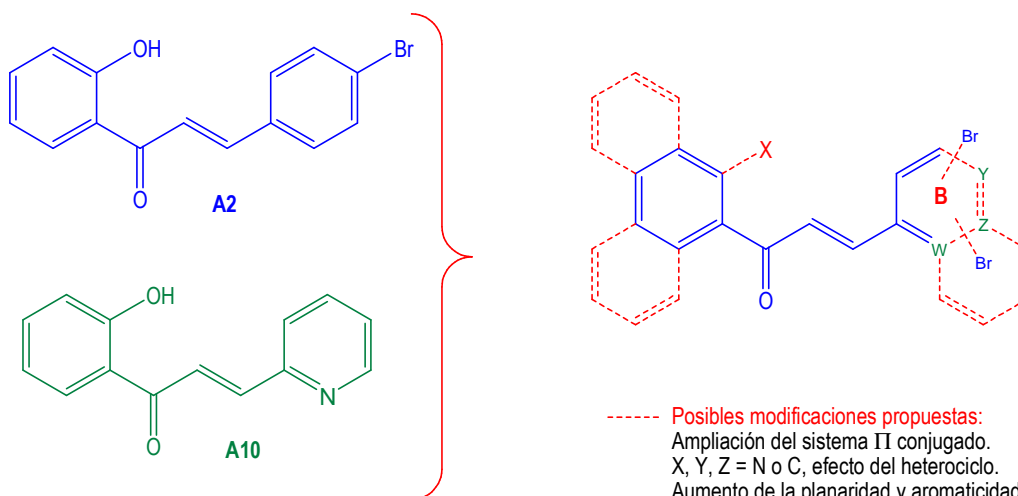


----- Posibles modificaciones propuestas:
Ampliación del sistema π conjugado.
Aumento de la planaridad y aromaticidad.
Aumento de la lipofilia y el volumen.
Efecto de $X = OH$ o H .

Figura 2.2. Esquema del diseño de la Serie I.

SERIE II

Productos Derivados de la Chalconas A2 y A10:



----- Posibles modificaciones propuestas:
Ampliación del sistema π conjugado.
 $X, Y, Z = N$ o C , efecto del heterociclo.
Aumento de la planaridad y aromaticidad.
Aumento de la lipofilia y el volumen.
Efecto de $X = OH$ o H .
Localización, ausencia de $-Br$

Figura 2.3. Esquema del diseño de la Serie II.

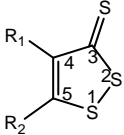
SERIE III

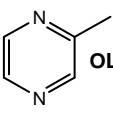
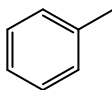
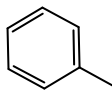
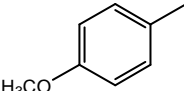
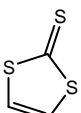
Combinación de dos Farmacóforos Inductores de Enzimas Detoxificantes en la Misma Estructura Química.

Como parte de los objetivos de esta tesis se encuentra la búsqueda de nuevas moléculas, en particular heterociclos con actividad farmacofórica no descrita como inductores monofuncionales de enzimas de fase II. Para esto, se seleccionan de una quimioteca propia (ver página 41) heterociclos estructuralmente relacionados con el sistema 1,2-ditio-3-tiona. Este heterociclo es un potente farmacóforo activador de la vía Nrf2-ARE, llegando incluso algún derivado como el **oltipraz** a ser estudiado en ensayos de fase clínica I y II como se describe más adelante. Es por eso que en nuestra selección se consideró al heterociclo 1,2-ditio-3-tiona como prototipo molecular.

Muchos agentes, estructuralmente no relacionados con el sistema ditioltiona, incluidos heterociclos poliaromáticos, barbituratos, antioxidantes fenólicos, curcuminoides, cinamatos, isotiocianatos, lactonas, tiocarbamatos⁴⁷ y ciertos flavonoides como los descritos anteriormente, han demostrado inducir genes de las enzimas de fase II. Específicamente, nuestro grupo ha demostrado que ciertos flavonoides sintéticos (tabla 2.1) son capaces de incrementar la actividad de estas enzimas en hígados de ratas tratadas oralmente con los mismos (figura 2.1). Por otro lado, derivados sencillos del sistema heterocíclico 1,2-ditio-3-tiona han demostrado ser excelentes inductores de genes de enzimas de fase II (figuras 2.4 y 2.5). Sin embargo, no se han estudiado compuestos híbridos de este heterociclo con capacidad quimiopreventiva.

Figura 2.4. Estructura de los derivados de 1,2-ditio-3-tiona descritos en la bibliografía como potenciales agentes quimiopreventivos, aquí denominados **A17-A35**.



Comp.	R ₁	R ₂
A17	H	H D3T
A18	CH ₃	 OLTIPRAZ
A19	H	CH ₃
A20	CH ₃	H
A21	H	CH ₂ CH ₃
A22	CH ₂ CH ₃	H
A23	H	C(CH ₃) ₃
A24	—CH ₂ CH ₂ CH ₂ —	
A25	—CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ —	
A26	H	
A27		H
A28	H	CONH ₂
A29	CONH ₂	H
A30	CH ₃	SCH ₃
A31	CH ₃	CH=CHN(CH ₃) ₂
A32	CH ₃	S [⊖] NH ₂ (CH ₃) ₂
A33	H	
A34		A35
1,3-ditio-2-tiona D2T		5-(dimetilamino)-3H-1,2,4-ditiazol-3-tiona

⁴⁷ Cabrera, M. Inductores de glutatión S-transferasas como agentes quimiopreventivos para el cáncer. *Trabajo especial I*, Licenciatura en Bioquímica, Facultad de Ciencias, Udelar. Montevideo, Uruguay. 2005.

Ditiooltionas

Las 1,2-ditio-3-tionas fueron descritas por primera vez en 1958 por un grupo de investigadores alemanes, que aislaron 2 de ellas de repollo y repollito de Bruselas. Una se identificó como la 3H-1,2-ditio-3-tiona (**D3T**), una ditiooltiona no sustituida. Sobre la otra se sugirió que poseía un anillo aromático oxigenado en la posición 5 (**A33**, ver figura 2.4). Estudios posteriores mostraron que estas ditiooltionas estaban presentes en muy bajas cantidades en las especies vegetales de las cuales se aislaron inicialmente, pero plantearon la posibilidad de que se formaran *in vivo* por biotransformación de precursores que si se encuentran en estas especies. Las ditiooltionas naturales, y varios análogos sintéticos sustituidos, poseen propiedades quimiopreventivas contra la adquisición de cáncer y actividad antioxidante, las más estudiadas en este sentido se muestran en la figura 2.4. Oltipraz, el derivado sintético de 1,2-ditio-3-tionas más estudiado (**A18**, figura 2.4), confirmó *in vivo*, por primera vez, el efecto quimiopreventivo de estos compuestos al proteger ratones de la hepatotoxicidad inducida por tetracloruro de carbono y acetaminofeno.⁴⁸ Este efecto está determinado en gran parte por la capacidad de las ditiooltionas de inducir las enzimas detoxificantes de fase II. Dado que ejercen su activación estimulando la transcripción de estas enzimas mediada por el elemento ARE, las ditiooltionas son consideradas inductores monofuncionales. Su capacidad de inducción de los genes que codifican GSTs no se observó en ratones *knockout* para el gen *nrf2*.⁴⁹ Oltipraz es el miembro mejor caracterizado como quimiopreventivo para el cáncer de los agentes pertenecientes a la familia de las ditiooltionas. Ansher y colaboradores (1983) hipotetizaron por primera vez que el oltipraz podía ser un buen agente quimiopreventivo mediando la detoxificación de carcinógenos dada su capacidad de inducir enzimas de fase II. Seguidamente, en 1986, Wattenberg y Bueding demostraron su poder quimiopreventivo en ratas tratadas con dos carcinógenos diferentes. OPZ reduce los adenomas pulmonares inducidos con benzo[a]pireno en un 30% y en un 50% tumores estomacales promovidos por dietilnitrosoamina. Más adelante se corrobora su capacidad quimiopreventiva frente a otros carcinógenos que inducen neoplasias en diferentes órganos, entre los que se halla: traquea, pulmones, estómago, intestino delgado, colon, páncreas, hígado, vejiga, glándula mamaria, células hematopoyéticas y piel.^{48,50} Su efecto quimiopreventivo ha sido atribuido tanto a su habilidad de inducir la expresión de los genes de GSTs y otras enzimas de fase II, como a su capacidad inhibitoria de la bioactivación de procarcinógenos catalizada por citocromos P450.⁵¹

⁴⁸ Kensler, T.; Curphey, T.; Maxiutenko, Y.; Roebuck, B. Chemoprevention by organosulfur inducers of phase 2 enzymes: dithiolethiones and dithiins. *Drug Metabol. Drug Interact.* 2000, 17: 3-22.

⁴⁹ Kwak, M.; Egner, P. A.; Dolan, P. M.; Ramos-Gómez, M.; Groopman, J. D.; Itoh, K.; Yamamoto, M.; Kensler, T. W. Role of phase 2 enzyme induction in chemoprotection by dithiolethiones. *Mut. Res.* 2001, 480-481: 305-315.

⁵⁰ Wattenberg, L.; Bueding, E. Inhibitory effects of 5-(2-pyrazinyl)-4-methyl-1,2-dithiol-3-thione (oltipraz) on carcinogenesis induced by benzo[a]pyrene, diethylnitrosamine and uracilmustard. *Carcinogenesis*, 1986, 7: 1379-138.

⁵¹ Konwinski, R. R.; Haddad, R.; Chun, J. A.; Klenow, S.; Larson, S. C.; Haab, B. B.; Furge, L. L. Oltipraz, 3H-1,2-dithiole-3-thione, and sulforaphane induce overlapping and protective antioxidant responses in murine microglial cells. *Toxi. Lett.*, 2004, 153: 343-355.

A diferencia de otros candidatos potenciales como agentes quimiopreventivos para el cáncer, oltipraz ha sido usado en estudios clínicos. Inicialmente se estudió la actividad biológica de oltipraz como fármaco antihelmíntico. Se han descrito al menos 18 de estos ensayos en la quimioterapia de la esquistosomiasis. Estos estudios iniciales involucraron más de 1200 pacientes y promovieron el emprendimiento de estudios clínicos de fase I y II enfocados en la actividad quimiopreventiva para el cáncer. Estudios de fase I indicaron que dosis de 125-500 mg de oltipraz por día podían inducir las enzimas detoxificantes de fase II.⁵² Posteriormente se llevaron a cabo estudios clínicos de fase IIa y IIb, de forma de analizar directamente la hipótesis de que el oltipraz podría modificar el metabolismo de carcinógenos en humanos. Estos estudios fueron llevados a cabo con personas de un pueblo rural de China. Los residentes de esta área presentaban un alto riesgo de desarrollar carcinoma hepático debido principalmente al consumo de alimentos contaminados con aflatoxina. En el estudio de fase IIa se encontró que 125 mg/día eran suficientes para incrementar significativamente los niveles del metabolito de AFB1 resultante de la vía del ácido mercaptúrico en la orina. En estudios de fase IIb se observó que la administración de 500 mg de oltipraz una vez a la semana producía una reducción significativa del biomarcador aducto aflatoxina-albúmina en sangre.⁵³

Se ha descrito que el tratamiento de ratas con 0.1 ó 0.3 mmol/Kg de peso corporal con **D3T**, **OPZ** y con el compuesto **17** (ver figura 2.4) inhibe las lesiones preneoplásicas inducidas por AFB, mientras que el tratamiento con 1,3-ditiol-2-tiona (**D2T**, compuesto **A34** figura 2.4) no es eficaz en este sentido. Un estudio posterior mostró que el heterociclo 1,2,4-ditiazol-3-tiona sustituido en posición 5, compuesto **A35** de la figura 2.4, tampoco protegía de la citotoxicidad de la aflatoxina B1. Estos hallazgos sugieren que el anillo 3H-1,2-ditiol-3-tiona juega un rol esencial en la protección frente a carcinógenos.

De los 19 compuestos que se muestran en la figura 2.4, los compuestos **A17** – **A32** se evaluaron *in vivo* como inductores de glutatión transferasa en ratas a las que se les administró 1 mmol de ditioltiona/kg de peso durante 48 horas previo al ensayo. La inducción se expresó como la tasa de actividad GST entre los animales tratados y un grupo control. Once agentes quimiopreventivos mostraron mayor poder inductor que el oltipraz, siendo muy significativa la diferencia en la inducción mostrada por los compuestos **A19** y **A31** (ver figura 2.5).⁵⁴

⁵² Roebuck, B. D., Curphey, T. J.; Li, Y.; Baumgartner, K. J.; Bodreddigari, S.; Yan, J.; Gange, S. J.; Kensler, T. W.; Sutter, T. R. Evaluation of the cancer chemopreventive potency of dithiolethione analogs of oltipraz. *Carcinogenesis*, 2003, 24: 1919-1928.

⁵³ Kensler, T. W.; He, X.; Otieno, M.; Egner, P. A.; Jacobson, L. P.; Chen, B.; Wang, J. S.; Zhu, Y.; Zhang, B.; Wang, J. B.; Wu, Y.; Zhang, Q.; Qian, G.; Kuang, S.; Fang, X.; Li, Y.; Yu, L.; Prochaska, H. J.; Davidson, N. E.; Gordon, G. B.; Gorman, M. B.; Zarba, A.; Enger, C.; Muñoz, A.; Helzlsouer, K. J.; Groopman, J. D. Oltipraz chemoprevention trial in Qidong, People's Republic of China: modulation of serum aflatoxin albumin adduct biomarkers. *Cancer Epidemio., Biomarkers Prevent.*, 1998, 7: 127-134.

⁵⁴ Maxuitenko, Y. Y.; Libby, A. H.; Joyner, H. H.; Curphey, T. J.; MacMillan, D. L.; Kensler, T. W.; Roebuck, B. D. Identification of dithiolethiones with better chemopreventive properties than oltipraz. *Carcinogenesis*, 1998, 19: 1609-1615.

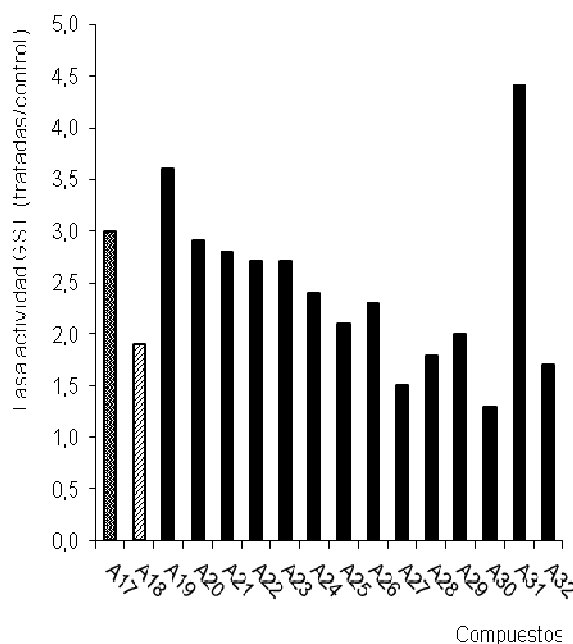


Figura 2.5. Estudio de la inducción de GST por los compuestos **A17-A32**. Se grafica la relación de actividad GST entre ratas tratadas con 1 mmol/Kg y ratas control.

Adaptado de ⁵⁴.

Se ha probado en repetidos estudios que la ditioltionona parental **D3T** exhibe un poder significativamente mayor como quimiopreventivo para el cáncer que oltipraz, ya sea tanto a nivel de la inducción de GSTs y otras enzimas de fase II como en la observación directa del efecto a través de estudios de carcinogénesis inducida químicamente.^{48, 52}

Los antecedentes previos, cuando se describió por primera vez que oltipraz elevaba los niveles de enzimas de fase II, generados de las evaluaciones de éste como antihelmíntico sirvieron como plataforma para los futuros estudios de este derivado como quimiopreventivo. Se centraron todos los esfuerzos en esta dirección y dejaron de lado otros compuestos de la familia de las 1,2-ditiol-3-tiona que han mostrado mayor actividad, inclusive el compuesto parental, **D3T**.

Oxoanálogos

Los óxidos de oxatioleno son una serie de compuestos análogos a las ditioltiononas que representan una nueva familia de agentes inductores de enzimas de fase II y son potenciales agentes quimiopreventivos para el cáncer. De los compuestos mostrados en la figura 2.6, **A36** fue el inductor más potente de enzimas de fase II. Análisis de *Northern blot* muestra un incremento en los niveles de ARN mensajero de GST, QR y ferritina de forma dosis dependiente en células previamente tratadas con **A36**. Cuando se examina el aumento en la actividad GST en líneas celulares con el receptor Ah normal (*wild type*) y mutado, no se observaron diferencias. Estos resultados

sugieren que estos compuestos son inductores monofuncionales, lo que coincide con la incapacidad de **A36** de inducir actividad CYP4501A1.⁵⁵

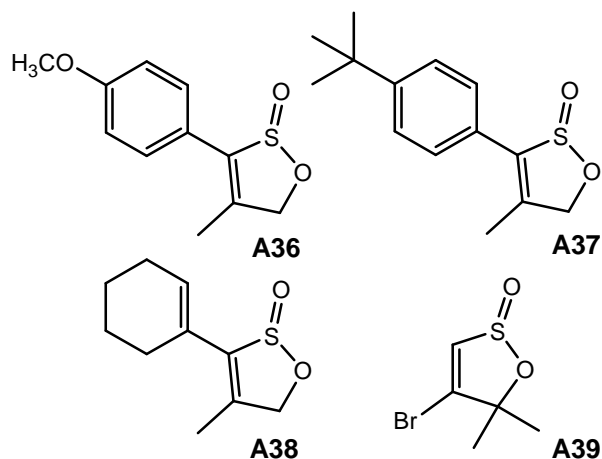


Figura 2.6. Estructura de los óxido de oxatioleno analizados como potenciales agentes quimipreventivos. Adaptado de ⁵³

⁵⁵ Pietsch, E. C.; Hurley, A. L.; Scott, E. E.; Duckworth, B. P.; Welker, M. E.; Leone-Kabler, S.; Townsend, A. J.; Torti, F. M.; Torti, S. V. Oxathiolene oxides: a novel family of compounds that induce ferritin, glutathione S-transferase, and other proteins of phase II response. *Biochem. Pharmacol.* 2003, 65: 1261-1269.

Es así que en base a los antecedentes descritos para los derivados de 1,2-ditiol-3-tiona y el resultado de los estudios de diferentes sistemas heterociclos estructuralmente relacionados que surgen de la búsqueda de nuevos farmacóforos a partir de nuestra quimioteca, se diseña la **SERIE III** con sistemas híbridos de furoxanil-chalconas como se presenta en el esquema a continuación:

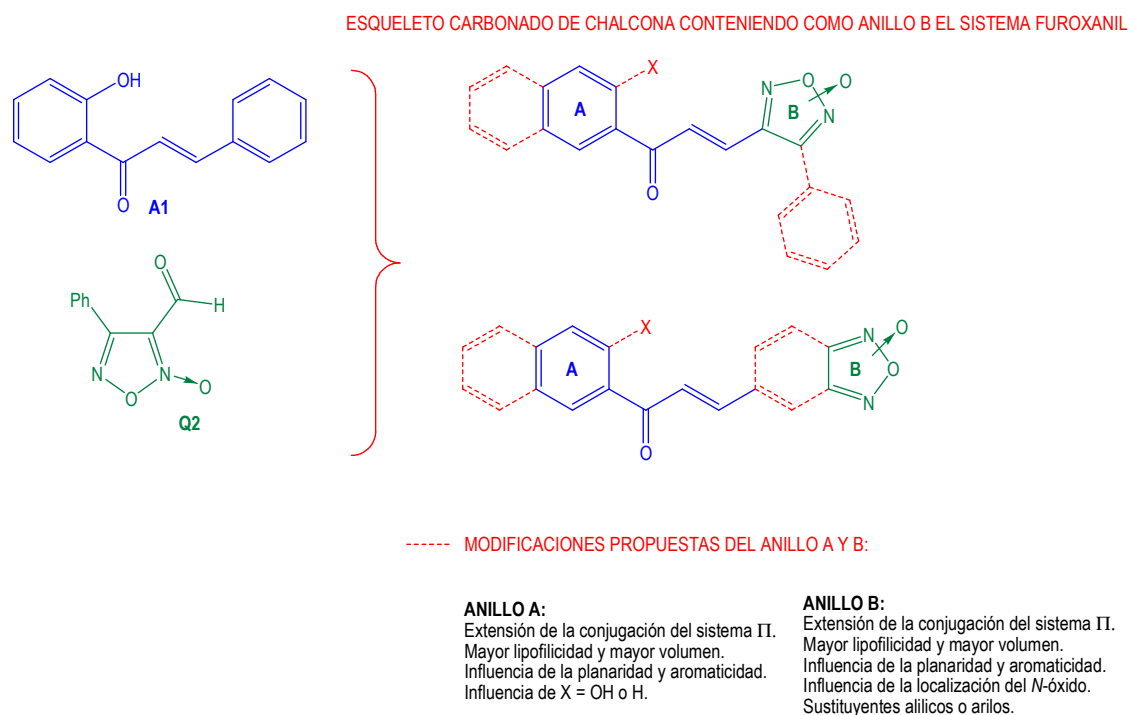


Figura 2.7. Esquema del diseño de la Serie III.

ACTIVIDAD BIOLÓGICA

En cuanto a las actividades biológicas a desarrollarse en esta tesis, se esquematizan en la figura 2.8, a continuación. Se diseñan los ensayos que se detallan en parte experimental (página 111), así como también algunas consideraciones en discusión biológica (página 86).

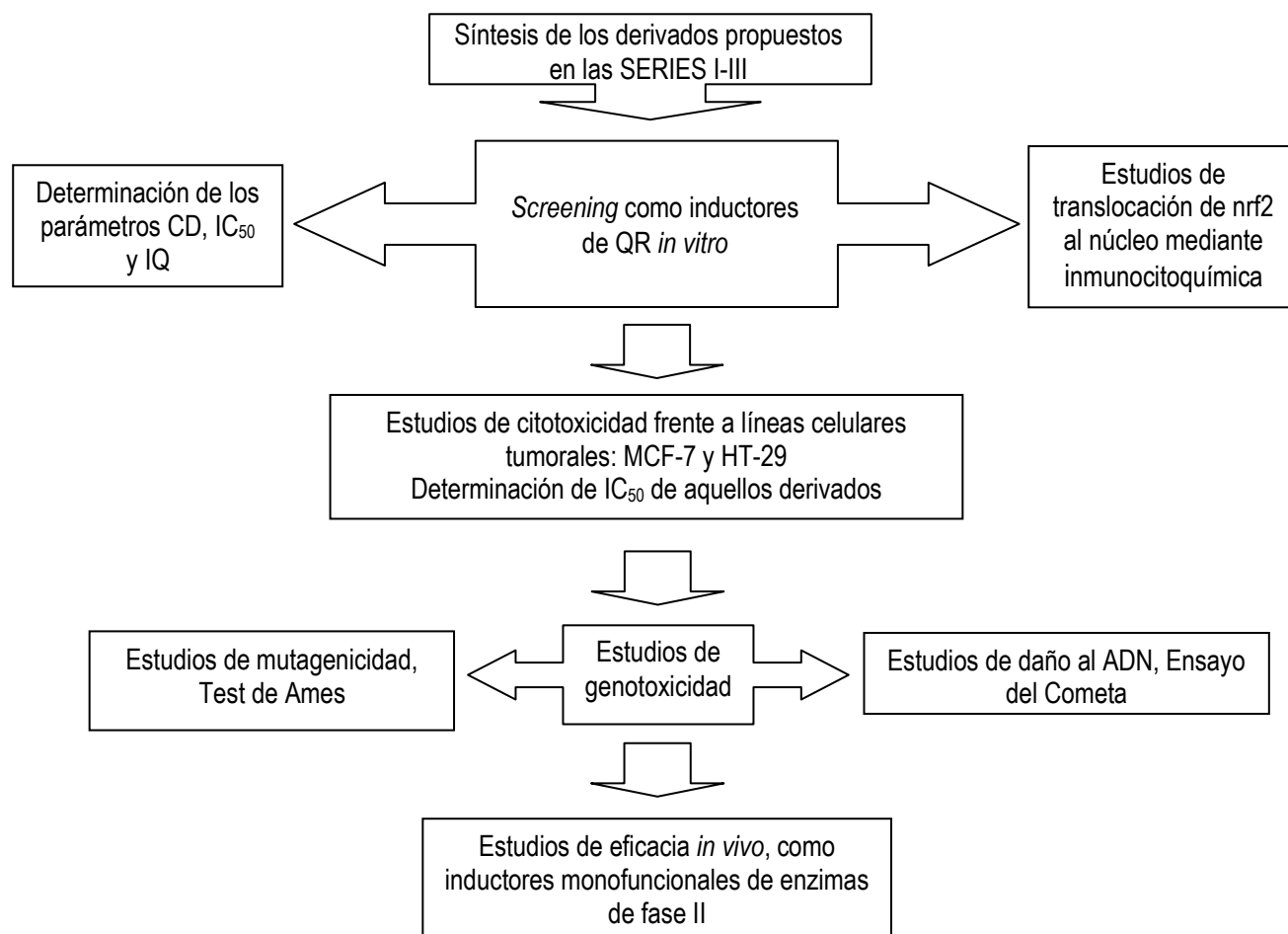
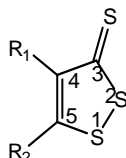


Figura 2.8. Esquema de las actividades biológicas a desarrollarse.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

BÚSQUEDA DE NUEVAS ENTIDADES FARMACOFÓRICAS.

Como parte de los objetivos de esta tesis se encuentra la búsqueda de nuevas moléculas, en particular heterociclos con actividad farmacofórica no descrita como inductores monofuncionales de enzimas de fase II. Para esto, los compuestos estudiados fueron seleccionados utilizando los siguientes criterios: i) heterociclos de cinco miembros, o ii) agentes que contienen centros aceptores de Michael, y ambos, estructuralmente relacionados con el sistema 1,2-ditiol-3-tiona.



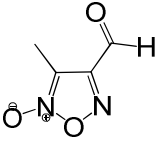
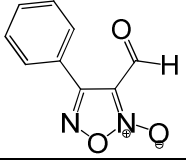
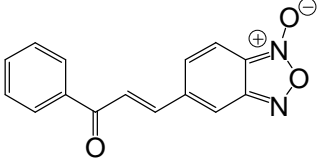
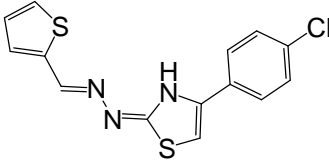
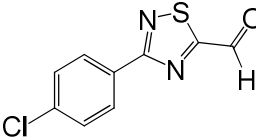
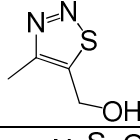
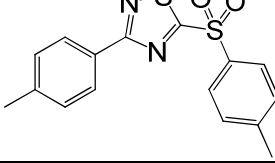
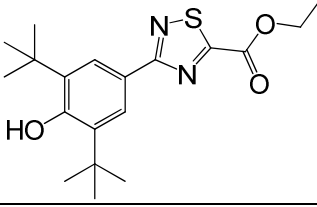
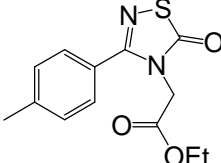
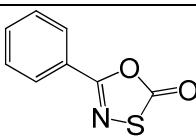
Como se mencionó en antecedentes, este heterociclo es un potente farmacóforo activador de la vía Nrf2-ARE, llegando incluso algún derivado como el oltipraz a ser estudiado en ensayos de fase clínica I y II⁵⁶.

Se realizó entonces un tamizaje primario de 28 compuestos (tabla 3.1 a-d) pertenecientes a diferentes quimiotipos de una biblioteca generada por nuestro grupo, evaluando actividad QR monofuncional vía Nrf2-ARE. Los compuestos estudiados, seleccionados según los criterios mencionados, pertenecen a los siguientes 14 quimiotipos:

1. Furoxano
2. Benzofuroxano
3. Tiazol
4. Tiadiazol
5. Oxatiazol
6. Pirazol
7. Indazol
8. Imidazol
9. Benzimidazol
10. 1,2,4-triazina
11. Oxadiazol[2,3-a]quinoxalina
12. Cumarina
13. Dihidropirimidinonas
14. o-benzoquinona oxima

⁵⁶ Roebuck, B. D., Curphey, T. J.; Li, Y.; Baumgartner, K. J.; Bodreddigari, S.; Yan, J.; Gange, S. J.; Kensler, T. W.; Sutter, T. R. Evaluation of the cancer chemopreventive potency of dithiolethione analogs of oltipraz. *Carcinogenesis*. 2003, 24: 1919-1928.

Tabla 3.1a. Inducción *in vitro* de QR por los compuestos Q1-Q10.

Ref.	QT	Estructura	Tasa inducción QR*	
			Hepa1c1c7	BprC1
Q1	FUROXANO BENZOFUROXANO		0.98 ± 0.30	1.36 ± 0.43
Q2			4.20 ± 0.02	2.37 ± 0.30
Q3			1.10 ± 0.03	1.70 ± 0.10
Q4	TIAZOL TIADIAZOL OXATIAZOL		0.99 ± 0.05	1.80 ± 0.40
Q5			1.49 ± 0.50	1.32 ± 0.40
Q6			1.22 ± 0.03	0.91 ± 0.02
Q7			1.99 ± 0.20	1.55 ± 0.09
Q8			1.21 ± 0.11	1.17 ± 0.11
Q9			1.38 ± 0.70	0.94 ± 0.66
Q10			0.98 ± 0.55	1.70 ± 0.64

* células tratadas/ células control negativo ± DE; QT: quimiotipo. Dosis evaluada 10 µM.

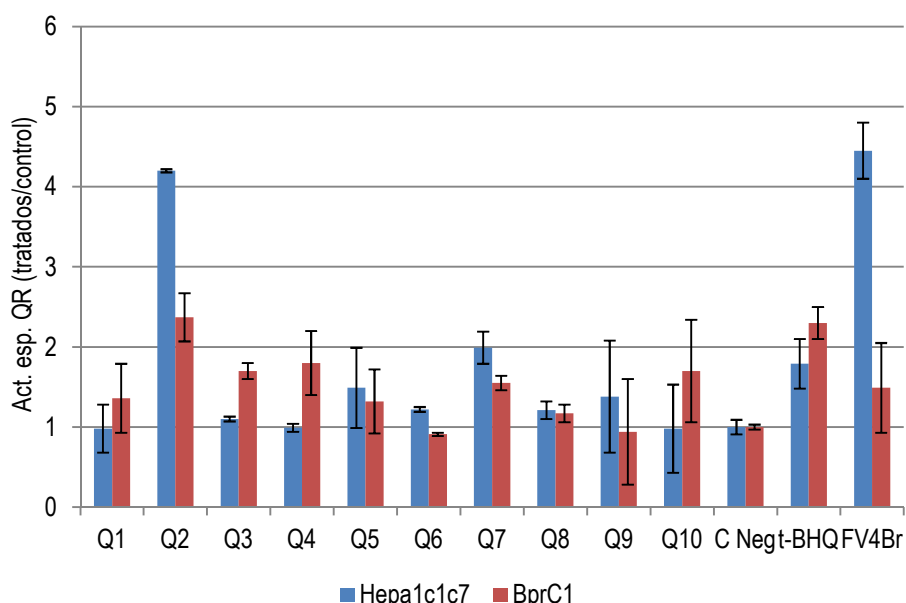
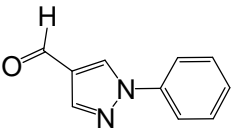
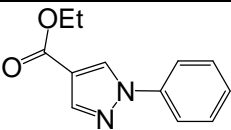
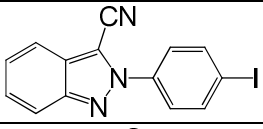
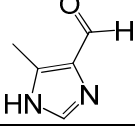
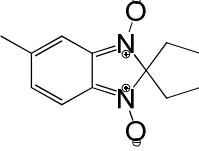
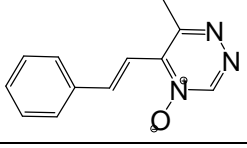
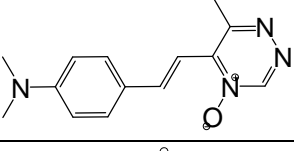
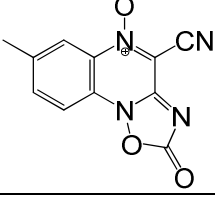


Figura 3.1. Inducción de QR en células Hepa1c1c7 y BprC1, tratadas con los compuestos **Q1-Q10** a una concentración de 10 μ M. La inducción se expresa como tasa de Act. Esp. QR (células tratadas/células control negativo). C Neg (control negativo, células sin tratar). (*) La diferencia en la actividad enzimática entre tratados y controles es estadísticamente significativa ($P < 0.1$) según test *t* de Student con $n = 3$.

De los diez compuestos evaluados presentados en tabla 3.1a y figura 3.1, tres resultaron inactivos o mostraron escasa actividad en la inducción de QR en ambas líneas celulares, estos son **Q1**, **Q6** y **Q8**. El derivado **Q9** si bien presenta mayor actividad que estos cuatro, el resultado muestra gran dispersión por lo que no posee validez estadística. Cinco compuestos exhiben moderada actividad en al menos una línea celular, estos son **Q3**, **Q4**, **Q5**, **Q7** y **Q10**, si bien la inducción registrada para **Q5** y **Q10** posee gran dispersión. El compuesto **Q2** resultó ser un potente inductor, y registró la mayor tasa de inducción en ambas líneas celulares. La inducción lograda por **Q2** y **Q7** es estadísticamente significativa, duplicándose la actividad QR respecto al control negativo en el caso de **Q7** y obteniéndose incluso mejores valores para **Q2**. Cabe destacar que si bien ambos presentan un pequeño carácter bifuncional, la actividad registrada por **Q7** es muy similar a la del control positivo *t*-BHQ y **Q2** presenta marcada inducción con excelentes valores que son además estadísticamente significativos. Cuando se compara la actividad de quimiotipos similares como lo son los heterociclos tiazol, tiadiazol y oxatiazol, el único promotor de los siete evaluados es el tiadiazol **Q7**. Esto hace pensar que tal vez el agrupamiento farmacofórico responsable de la actividad sea una sulfona adecuadamente sustituida, y no el heterociclo en cuestión ya que **Q7** es el único que posee este agrupamiento dentro de los evaluados. Existen descripciones previas de inductores monofuncionales (sulforafano y 6-HICT) que en estudios estructura-actividad de análogos con

diferente estado de oxidación del azufre se evidencia una fuerte contribución a la actividad cuando el azufre está en su máximo grado de oxidación, en forma de sulfona.⁵⁷

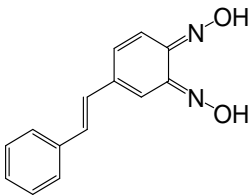
Tabla 3.1b. Inducción *in vitro* de QR por los compuestos Q11-Q19.

Ref.	QT	Estructura	Tasa inducción QR*	
			Hepa1c1c7	BprC1
Q11	PIRAZOL INDAZOL		1.22 ± 0,40	1.32 ± 0.46
Q12			1.43 ± 0.30	1.57 ± 0.16
Q13			9.51 ± 2.07	1.18 ± 0.74
Q14	IMIDAZOL BENZIMIDAZOL		0.98 ± 0.39	0.96 ± 0.30
Q15			2.78 ± 1.1	0.84 ± 0.13
Q16	TRIAZINA		1.83 ± 0.19	1,70 ± 0.20
Q17			2.08 ± 0.21	1.08 ± 0.17
Q18	OXADIAZOL QUINOXALINA		1,15 ± 0.46	1.18 ± 0.31

Continúa ...

⁵⁷ Morimitsu, Y.; Nakagawa, Y.; Hayashi, K.; Fujii, H.; Kumagagi, T.; Nakamura, Y.; Osawa, T.; Horio, F.; Itoh, K.; Lida, K.; Yamamoto, Masayuki.; Uchida K. A sulforaphane analogue that potently activates the Nrf2-dependent detoxification pathway. *J. Biol. Chem.* 2002, 227: 3456-3463.

Tabla.3.1b. continuación ...

Ref.	QT	Estructura	Tasa inducción QR*	
			Hepa1c1c7	BprC1
Q19	o-BENZOQUINONA OIMINA		4,70 ± 1,11	1,00 ± 0,09

* células tratadas/ células control negativo ± DE; QT: quimiotipo; dosis 10 μ M.

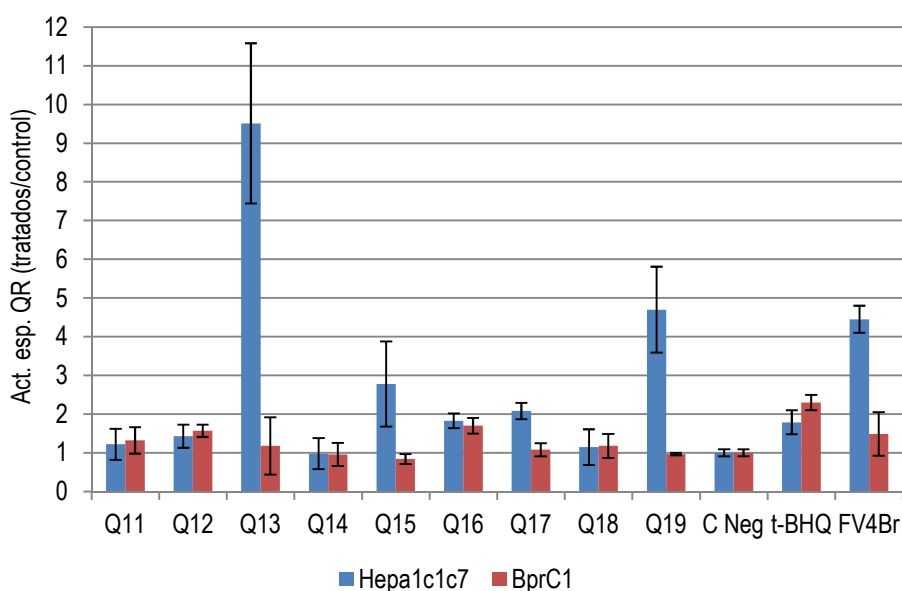


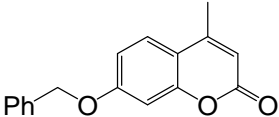
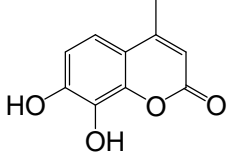
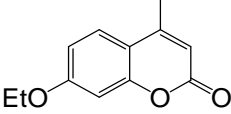
Figura 3.2. Inducción de QR en células Hepa1c1c7 y BprC1, tratadas con los compuestos **Q11-Q19** a una concentración de 10 μ M. La inducción se expresa como tasa de Act. Esp. QR (células tratadas/células control negativo). C Neg (control negativo, células sin tratar). (*) La diferencia en la actividad enzimática entre tratados y controles es estadísticamente significativa ($P < 0.1$) según test t de Student con $n = 3$.

Cuando se analiza la inducción mostrada por los compuestos **Q11-Q19** (figura 3.2 y tabla3.1b) resalta la presencia de dos derivados fuertes inductores bifuncionales que provocan un aumento en la Act. Esp. QR en cinco (**Q19**) y nueve veces (**Q13**) la del control negativo en células Hepa1c1c7, sin alterar la actividad registrada en BprC1. Poseen el mismo comportamiento bifuncional, aunque claramente menos marcado, los derivados **Q15** y **Q17**. Los compuestos **Q14** y **Q18** resultan ser inactivos en ambas líneas celulares mientras que **Q11** y **Q12** muestran de baja a moderada actividad, estadísticamente no significativa.

Otro dato interesante surge cuando se compara la inducción QR de **Q16** y **Q17**. Se trata de dos N^4 -óxido de 1,2,4-triazina que solamente difieren en la ausencia del sustituyente dimetilamino en **Q16** (ver estructura en tabla

3.1b). Este cambio en la estructura hace que **Q16** sea un inductor monofuncional que duplica la actividad del control negativo a 10 μM en ambas líneas celulares mientras **Q17** solamente duplica la actividad QR en la línea Hepa1c1c7, mostrando un carácter bifuncional. Este sistema heterociclo puede resultar interesante para realizar futuros estudios de estructura-actividad y de profundización en estudios de la actividad de nuevos derivados de este sistema.

Tabla 3.1c. Inducción *in vitro* de QR por los compuestos **Q20-Q22**.

Ref.	QT	Estructura	Tasa inducción QR*	
			Hepa1c1c7	BprC1
Q20	CUMARINA		1.12 \pm 0.10	0.96 \pm 0,07
Q21			0.97 \pm 0,02	1.15 \pm 0,18
Q22			1.02 \pm 0.10	0.97 \pm 0.08

* células tratadas/ células control negativo \pm DE; QT: quimiotipo; dosis 10 μM

En la tabla 3.1c y figura 3.3 se muestran los resultados obtenidos para tres cumarinas sintéticas. Cuando se analiza la inducción provocada por **Q20-Q22** se observa que las tres son inactivas, un resultado no esperado *a priori* dado que existen numerosas descripciones previas de cumarinas activas.^{58,59,60} Sin embargo, si bien se han descrito como activas muchas cumarinas naturales, los valores de CD publicados van desde 1 μM (cumarina sin sustituyente³) a 200 μM para algunas furanocumarinas presentes en cítricos,⁴ y existen pocas descripciones de análogos sintéticos activos. Para descartar una posible inducción a dosis mayores por parte de las cumarinas **Q20-Q22**, habría que estudiar su comportamiento evaluándolas a dosis superiores a la usada en nuestro ensayo (10 μM). El centro aceptor de Michael del anillo cromano fue identificado por el grupo de Talalay como agrupamiento farmacofórico responsable de la actividad.³ Nuestros resultados sugieren que el heterociclo cromano 4-metil sustituido podría estar desfavorecido estéricamente para ser atacado por nucleófilos como los –SH de Keap1. Dado que uno de nuestros objetivos es encontrar nuevos agrupamientos farmacofóricos, las cumarinas sintéticas no serán estudiadas más en detalle si bien podría ser interesante implementar estudios más exhaustivos del tipo estructura-actividad.

⁵⁸ Subramaniam, S.R.; Ellis, E.M. Esculetin-induced protection of human hepatoma HepG2 cells against hydrogen peroxide is associated with the Nrf2-dependent induction of the NAD(P)H: Quinone oxidoreductase 1 gene. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2011, 15; 250: 130-136.

⁵⁹ Talalay, P.; De Long, M. J.; Prochaska, H. J. Identification of a common chemical signal regulating the induction of enzymes that protect against chemical carcinogenesis. *Med. Sci.* 1988, 85: 8261-8265.

⁶⁰ Prince, M.; Li, Y.; Childers, A.; Itoh, K.; Yamamoto, M.; Kleiner, H.E. Comparison of citrus coumarins on carcinogen detoxifying enzymes in nrf2 knockout mice. *Toxicol Lett.* 2009, 185: 180–186.

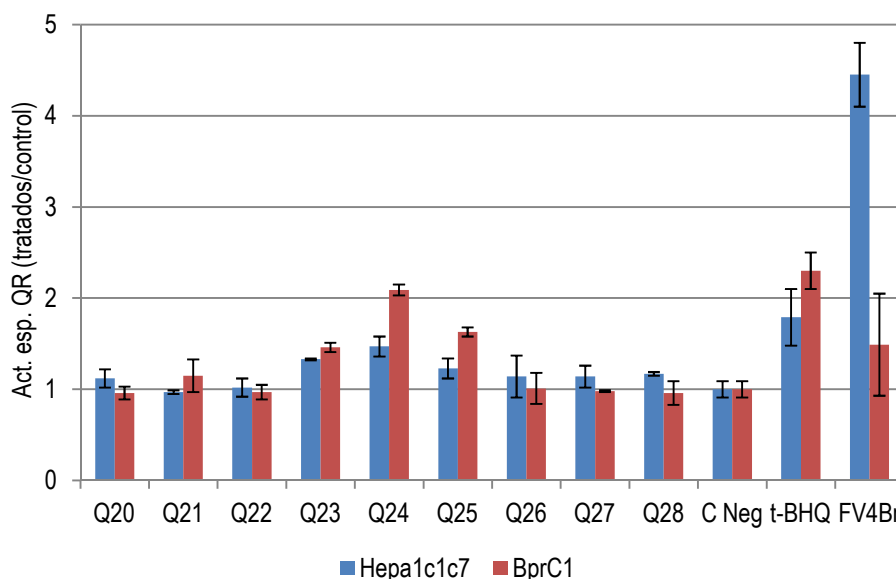


Figura 3.3. Inducción de QR en células Hepa1c1c7 y BprC1, tratadas con los compuestos **Q20-Q28** a una concentración de 10 μ M. La inducción se expresa como tasa de Act. Esp. QR (células tratadas/células control negativo). C Neg (control negativo, células sin tratar). (*) La diferencia en la actividad enzimática entre tratados y controles es estadísticamente significativa ($P < 0.1$) según test t de Student con $n = 3$.

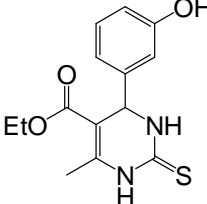
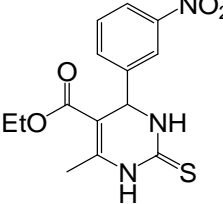
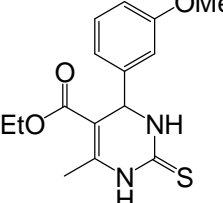
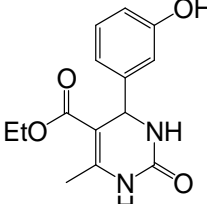
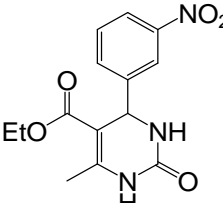
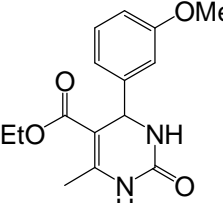
En la figura 3.3 y tabla 3.1c se presentan los resultados obtenidos para una serie de derivados sintéticos de pirimidinas, específicamente 1,4-dihidropirimidin-2-onas y 1,4-dihidropirimidin-2-tionas. No se han encontrado en la literatura descripciones de análogos de pirimidinas con actividad inductora de enzimas de detoxificación de xenobioticos de fase II. Sin embargo, se han desarrollado análogos de dihidropirimidinas con actividad quimioterápica para el cáncer como inhibidores de topoisomerasa I.⁶¹ En particular, algunas dihidropirimidinonas y dihidropirimidintionas de las presentadas en la tabla 3.1d han mostrado actividad citotóxica frente a líneas celulares tumorales y existe evidencia que actúan inhibiendo la formación del huso mitótico⁶². Además, **Q24** ha mostrado actividad antitumoral en modelos *in vivo*⁶³. El estudio de este sistema parece interesante ya que aporta un sistema aceptor de Michael dentro de un heterociclo.

⁶¹ Zhu, L.; Cheng, P.; Lei, N.; Yao, J.; Sheng, C.; Zhuang, C.; Guo, W.; Liu, W.; Zhang, Y.; Dong, G.; Wang, S.; Miao, Z.; Zhang, W. Synthesis and biological evaluation of novel homocamptothecins conjugating with dihydropyrimidine derivatives as potent topoisomerase I inhibitors. *Arch. Pharm.* 2011, 344: 726-734.

⁶² Russowsky, D.; Canto, R.F.; Sanches, S.A.; D'Oca, M.G.; de Fátima, A.; Pilli, R.A.; Kohn, L.K.; Antônio, M.A.; de Carvalho, J.E. Synthesis and differential antiproliferative activity of Biginelli compounds against cancer cell lines: Monastrol, oxo-monastrol and oxygenated analogues. *Bioorg. Chem.* 2006, 34: 173-182.

⁶³ Torres, B.G.; Uchôa, F.D.T.; Canto, R.F.S.; Crestani, A.; Russowsky, D.; Eifler-Lima, V.L.; Dalla Costa, T. Pharmacokinetic evaluation of the anticancer candidate LaSOM 65 after intravenous and intraperitoneal administration to rats. *Braz. Med. Chem.* 2010, A2, P43.

Tabla 3.1d. Inducción *in vitro* de QR por los compuestos Q23-Q28.

Ref.	QT	Estructura	Tasa inducción QR*	
			Hepa1c1c7	BprC1
Q23	DIHIDROPIRIMIDINONA		1.33 ± 0.01	1.46 ± 0.05
Q24			1.47 ± 0.11	2.09 ± 0.06
Q25			1.23 ± 0.11	1.63 ± 0.05
Q26			1.14 ± 0.23	1.01 ± 0.17
Q27			1.14 ± 0.12	0.98 ± 0,01
Q28			1.17 ± 0.02	0.96 ± 0.13

* células tratadas/ células control negativo ± DE; QT: quimiotipo; dosis 10 µM

Las tres dihidropirimidintionas evaluadas, **Q23-Q25**, mostraron de moderada a buena actividad inductora de QR monofuncional, siendo **Q24** la que muestra el mejor perfil estadísticamente significativo en ambas líneas celulares. Al analizar la actividad de los oxa análogos **Q26-Q28** es interesante notar que resultaron ser prácticamente inactivos. Esto muestra que el azufre juega un rol importante en la actividad farmacofórica, siendo

preponderante el cambio de isostero de O a S. Un estudio más profundo de estructura-actividad y profundización en estudios de la actividad de nuevos derivados de este sistema merece ser realizado sobre este quimiotipo.

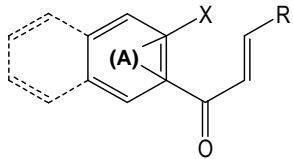
En resumen, los quimiotipos: furoxano, *N*-óxido de 1,2,4-triazina, y 1,4-dihidropirimidin-2-tiona resultaron ser prometedores como potenciales nuevos sistemas farmacofóricos inductores monofuncionales de enzimas de fase II, siendo los mejores derivados **Q2**, **Q16** y **Q24**, respectivamente.

Dada la versatilidad sintética de los furoxanos, se propone diseñar y sintetizar una serie de compuestos híbridos flavonoide-furoxano (Serie III) para evaluarlos como potenciales agentes quimiopreventivos para el cáncer (ver esquema, página 50).

SÍNTESIS DE LOS DERIVADOS PERTENECIENTES A LA SERIE I

Para la obtención de los derivados **SI-1** - **SI-11** (tabla 3.2) se utilizó la condición clásica de condensación aldólica de Claisen-Schmidt, NaOH en MeOH a reflujo y a temperatura ambiente, o ambos, según se indica en parte experimental, obteniéndose rendimientos de buenos a excelentes.^{64,65}

Tabla 3.2. Productos obtenidos pertenecientes a los diseñados dentro de la serie I.



Derivado	anillo (A)	-X	posición carbonilo	-R
SI-1	fenilo	-OH	-	1-naftil
SI-2	fenilo	-OH	-	2-naftil
SI-3	fenilo	-H	-	1-naftil
SI-4	fenilo	-H	-	2-naftil
SI-5	naftilo	-2-OH	1	fenil
SI-6	naftilo	-1-OH	2	fenil
SI-7	naftilo	-H	1	fenil
SI-8	naftilo	-H	2	fenil
SI-9	naftilo	-2-OH	1	1-naftil
SI-10	naftilo	-2-OH	1	2-naftil
SI-11	naftilo	-1-OH	2	2-naftil

En todos los casos el 2-naftaldehído reacciona más rápidamente que el 1-naftaldehído cuando se compara la reactividad frente al enolato de la misma acetofenona, pero no afecta significativamente los rendimientos obtenidos, esto coincide con descripciones previas de la bibliografía.⁶⁶ Así por ejemplo la síntesis de **SI-3** requiere 7 h más de calentamiento a reflujo que la preparación de **SI-4**. Se observa el mismo comportamiento cuando se compara **SI-1** con **SI-2**. En el caso de **SI-10** y **SI-9**, el tiempo de reacción es el mismo pero cromatográficamente se evidencia aparición de producto primeramente en la síntesis de **SI-10**. Cuando se sintetizan chalconas conteniendo naftaleno como anillo A partiendo de las correspondientes 1- ó 2-acetonaftonas se obtienen rendimientos y tiempos de reacción adecuados pero sin evidenciarse tendencias claras en la reactividad diferencial de estas dos cetonas análogamente a lo que ocurre cuando se comprara 1- y 2-naftaldehído. Durante la purificación cromatográfica de los derivados **SI-5** y **SI-8** fue posible aislar los aldoles

⁶⁴ Nielsen, A.T.; Houlihan, W.J. The aldol condensation, *Organic Reactions*, John Wiley & Sons, Inc., 1968, 1^a Ed., Sydney, Australia, Vol 16: 1-438.

⁶⁵ Cabrera, M.; Simoens, M.; Falchi, G.; Lavaggi, M.L.; Piro, O.E.; Castellano, E.E.; Vidal, A.; Azqueta, A.; Monge, A.; López de Ceráin, A.; Sagrera, G.; Seoane, G.; Cerecetto, H.; González, M. Synthetic chalcones, flavanones, and flavones as antitumor agents: biological evaluation and structure-activity relationships. *Bioorg. Med. Chem.* 2007, 15: 3356-3367.

⁶⁶ Denmark, S.E.; Beutner, G.L.; Wynn, T.; Eastgate, M.D. Lewis base activation of lewis acids: catalytic, enantioselective addition of silyl ketene acetals to aldehydes. *J. Am. Chem. Soc.* 2005, 127: 3774-3789.

correspondientes **SI-5A** y **SI-8A** (ver figura 3.4). El derivado **SI-5** es particularmente sensible a sufrir reacción retroaldólica según se evidencia mediante cromatografía durante su síntesis y no es posible obtenerlo, sino que se aísla el aldol correspondiente (**SI-5A**, figura 3.4).

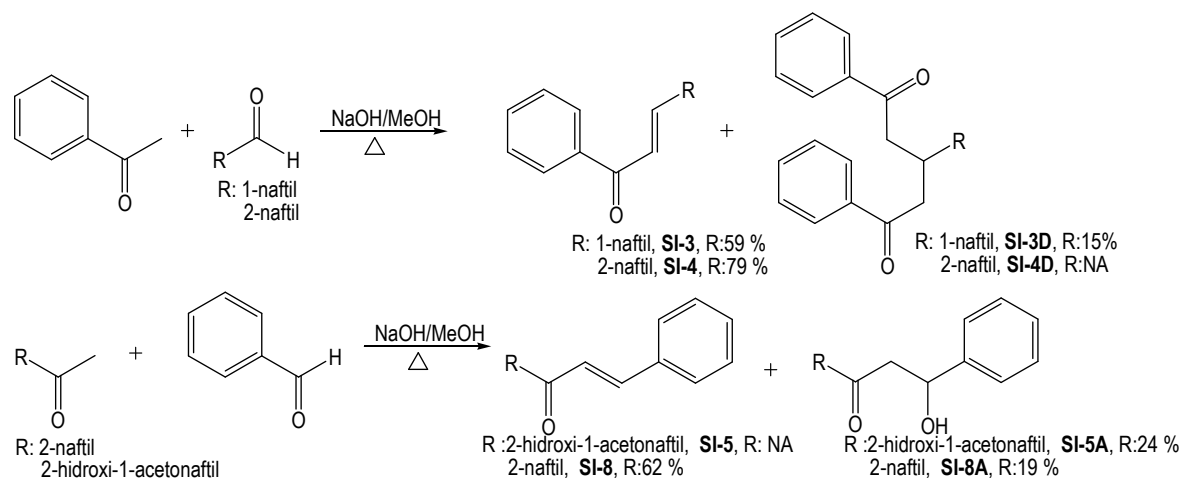


Figura 3.4. Esquema de los productos secundarios obtenidos durante la síntesis de los productos de la serie I. Nota: NA: producto no aislado.

Por otra parte, fue posible aislar también el subproducto **SI-3D** (ver figura 3.4) que resulta como consecuencia de la adición nucleofílica de Michael 1,4 de una segunda molécula del enolato de acetofenona al producto **SI-3**. Analizando la evolución cromatográfica de la síntesis del isómero de posición de **SI-3**, el derivado **SI-4**, se observa que se forma un producto de aspecto y R_f similar a **SI-3D**, si bien este no se aísla es probable que también se genere el compuesto análogo.

SÍNTESIS DE LOS DERIVADOS PERTENECIENTES A LA SERIE II.

En esta serie se sintetizaron los derivados, **SII-1** – **SII-9**, que se muestran en la tabla 3.3.

Tabla 3.3. Productos obtenidos pertenecientes a los diseñados dentro de la serie II.

Derivado	anillo (A)	-X	posición carbonilo	-R
SII-1	fenilo	-OH	-	2-bromo-3-piridinil
SII-2	fenilo	-OH	-	6-bromo-2-piridinil
SII-3	fenilo	-OH	-	5-bromo-3-piridinil
SII-4	naftilo	-1-OH	2	5-bromo-3-piridinil
SII-5	fenilo	-OH	-	4-quinolin
SII-6A^a	fenilo	-H	-	4-quinolin
SII-7	naftilo	-H	1	4-quinolin
SII-8	naftilo	-1-OH	2	4-quinolin
SII-9	naftilo	-H	2	4-quinolin

^a El único producto que pudo ser aislado es el aldol correspondiente.

En la síntesis de los derivados de bromopiridina de la Serie II se comenzó probando las condiciones clásicas de condensación aldólica ensayadas en la Serie I. Es así que para sintetizar el producto **SII-1** (tabla 3.3) se hizo reaccionar *o*-hidroxiacetofenona con el correspondiente bromopiridincarboxaldehído utilizando NaOH como base en MeOH a reflujo durante 2 h (figura 3.5). En este tiempo de reacción se obtiene un producto mayoritario, de menor *R_f* que el aldehído de partida, el cual se consume totalmente. El producto aislado y purificado mediante CC resulta ser el aldol correspondiente donde además parece ser que ha desplazado el Br a través de un re-arreglo 1,2. Esto se puede evidenciar por espectrometría de masas donde no se observa el ión molecular correspondiente al aldol (*m/z*: 321/323) ni tampoco picos con iguales abundancia alternados en dos unidades de *m/z*, que corroborasen la presencia de los dos isótopos (79/81) de igual abundancia del Br. A su vez, mediante experimentos bidimensionales de ¹H-RMN, COSY, se puede apreciar correlación entre un protón con desplazamiento de 7.62 ppm con los tres protones aromáticos del anillo piridínico (7.31, 7.79 y 8.64 ppm). Por otra parte, mediante espectroscopía de ¹H-RMN, se puede distinguir claramente los protones metilénicos del aldol a 3.22 y 3.14 ppm y el protón del carbono quiral que sustenta el hidroxilo de adición aldólica (H-C-OH) a 5.63 ppm.

Dado que no se obtiene el producto deseado es que se decide probar una base no nucleofílica con cierto impedimento estérico como lo es el *t*-BuOK, en THF como disolvente aprótico. En esta nueva condición se obtiene el producto deseado, **SII-1**, luego de 26 h a temperatura ambiente y 3 h de calentamiento a reflujo con buen rendimiento (55%). Inicialmente no se calentó para no aportar energía extra que favoreciese el re-arreglo y la eliminación del Br y luego al ver que la reacción no evolucionaba se decidió calentar a reflujo hasta observar desaparición cromatográfica de los reactivos (ver figura 3.5).

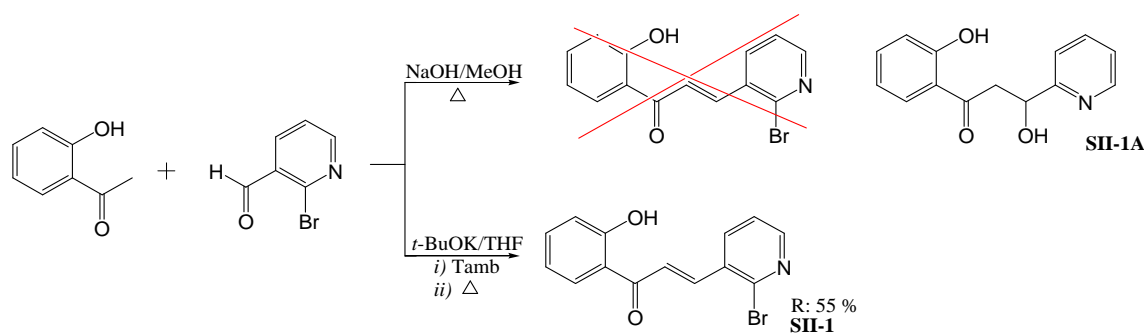
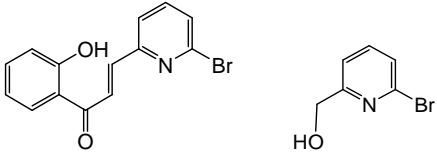


Figura 3.5. Esquema de las condiciones sintéticas ensayadas para la obtención de **SII-1**.

Es así, que para la síntesis de **SII-2** (tabla 3.4) se comienza ensayando las condiciones optimizadas para **SII-1** pero variando la temperatura. En este esquema sintético nos enfrentamos a la obtención de un segundo tipo de producto secundario. En las tres condiciones térmicas ensayadas (tabla 3.4) se evidencia la formación del producto de descomposición **SII-2C** (figura 3.6) que se obtiene mediante un mecanismo tipo Cannizzaro. El mecanismo, esquematizado en figura 3.6, involucra un proceso de auto reducción que implica la transferencia de un ion hidruro desde el intermedio de reacción, que resulta del ataque del *t*-BuO⁻ al carbonilo, a una segunda molécula de aldehído para dar el compuesto **SII-2C**. Cabe destacar que el otro producto generado, bromopicolinato de *t*-butilo, no fue aislado. Como se muestra en la tabla 3.4, el producto **SII-2C** se obtiene

mayoritariamente a bajas temperaturas y la formación del producto de interés **SII-2** aumenta concomitantemente con el aumento de la temperatura. Por otra parte pareciese que tiempos largos de reacción conllevan a descomposición de los productos formados según se evidencia mediante cromatografía en capa fina.

Tabla 3.4. Rendimientos y tiempos de reacción según se varía la temperatura para la obtención de **SII-2** y **SII-2C**, a partir de *o*-hidroxiacetofenona y 6-bromo-2-piridincarboxaldehído, en presencia de *t*-BuOK como base y THF como disolvente.

			
		SII-2	SII-2C
T (°C)	t (h)	R (%)	
0	2	NA*	20
T amb	14	16	6
66	0.7	29	NA*

* NA: producto no aislado

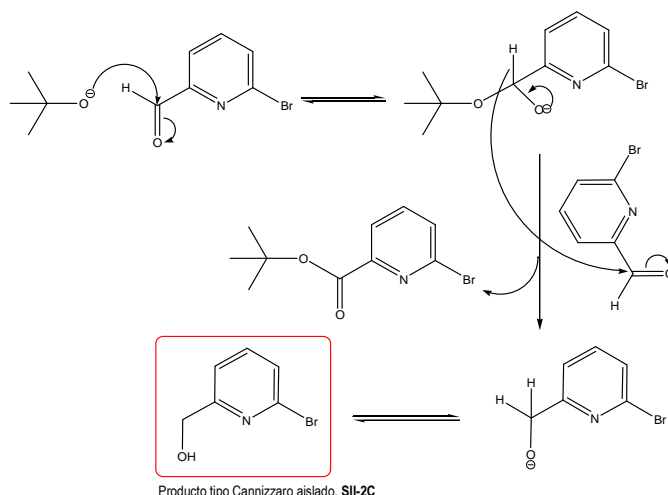


Figura 3.6. Mecanismo propuesto, tipo Cannizzaro, para la obtención del compuesto **SII-2C**.

Dado la susceptibilidad observada de los bromopiridincarboxaldehído a la presencia de base nucleofílicas se decide realizar un estudio de las mejores condiciones de obtención de **SII-2**, trabajando con un equipo de síntesis en paralelo, variando las bases utilizadas según se presentan en la tabla 3.5. En este estudio se observa claramente que a los 10 minutos de reacción ya se ha formado el producto tipo Cannizzaro, **SII-2C**, cuando se utiliza $\text{NaN}(\text{SiMe}_3)_2$ (condición 6, tabla 3.5) por lo que esta base es rápidamente descartada. Existen descripciones que el tratamiento de benzaldehído con $\text{LiN}(\text{SiMe}_3)_2$ puede producir alcohol bencílico y

bencilamida.⁶⁷ En ninguna de las otras condiciones ensayadas se evidencia la formación de este producto. La condición 3 (ver tabla 3.5) produce la formación del aldol correspondiente, **SII-2A**, como producto mayoritario. Este comportamiento puede deberse a que el catión Ba^{2+} puede coordinar con el carbonilo y el hidroxilo aldólico o con el hidroxilo y en N piridínico (ver figura 3.7). De esta forma se estabilizaría el producto de adición aldólica dificultando así que se produzca la eliminación.

Tabla 3.5. Estudio de la base a utilizar en la preparación de los productos de la serie II. Las reacciones son iniciadas al mismo tiempo, en un equipo de síntesis en paralelo, en THF a reflujo partiendo de *o*-hidroxiacetofenona y 6-bromo-2-piridincarboxaldehído (escala 10 μ M).

Condición	Base	RM ^a	Formación SII-2C	Formación SII-2	Observaciones
1	K ₂ CO ₃	3	NO	SI	Reacción incompleta luego de 24 h
2	K ₂ CO ₃	10	NO	SI	
3	BaO	3	NO	---	Se obtiene aldol pero no se observa el producto de eliminación
4	NaH ^b	3	NO	SI	Comportamiento similar, reacción completa a las 3h
5	<i>t</i> -BuOK	3	NO	SI	
6	NaN(SiMe ₃) ₂	3	SI	---	Condición descartada

^a RM: relación molar (base:cetona). ^b 60% m/V dispersión en aceite mineral

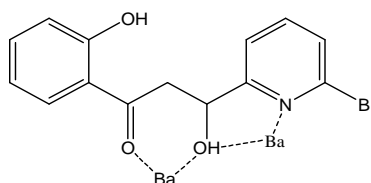


Figura 3.7. Compuesto de coordinación de **SII-2A** con Ba^{2+} , estructura propuesta

Existen descripciones que apoyan esta hipótesis, se han usado complejos de Ba^{2+} para catalizar la síntesis asimétrica de aldoles.⁶⁸ También se ha dilucidado la estructura de un polímero autoensamblado de flavona coordinado con bario.⁶⁹

⁶⁷ Zhang, L.; Wang, S.; Zhou, S.; Yang, G.; Sheng, E. Cannizzaro-type disproportionation of aromatic aldehydes to amides and alcohols by using either a stoichiometric amount or a catalytic amount of lanthanide compounds. *J. Org. Chem.* 2006, 71 (8): 3149-3153.

⁶⁸ Yamada, Y.M.A.; Shibasaki, M. Direct catalytic asymmetric aldol reactions promoted by a novel barium complex. *Tetrahedron Lett.* 1998, 9 (31): 5561-5564.

⁶⁹ Zhang, Z.T.; Shi, J.; He, Y.; Guo, Y.N. Self-assembly and crystal structure of a barium sulfonate chrysin coordination polymer. *Inorg. Chem. Commun.*, 2006, 9: 579-581.

En cuanto a la utilización de 3 ó 10 equivalentes de K_2CO_3 (condiciones 1 y 2, tabla 3.5) parecen no producir cambios significativos en el transcurso de la reacción ni en la formación de productos. A los 10 minutos se puede distinguir el producto de adición aldólica y a los 40 se evidencia la formación del producto deseado pero la reacción sigue avanzando lentamente hasta las 24 h, sin completarse.

Cuando se compara la utilización de NaH y *t*-BuOK (condiciones 4 y 5, tabla 3.5) se aprecia que se comportan en formas muy similares. Existe formación apreciable del aldol correspondiente y de **SII-2** desde los 10 minutos de reacción y los reactivos se consumen totalmente a las 3 h de reacción con poca generación de otros productos secundarios, según se observa por TLC. Se decide entonces ensayar la síntesis a mayor escala utilizando NaH como base de forma de aislar los productos y determinar su rendimiento. Es así que utilizando las condiciones sintéticas que se han optimizado, NaH en THF a reflujo durante 3h, se obtiene **SII-2** con 25 % de rendimiento versus 29 % utilizando *t*-BuOK en idénticas condiciones.

Los aldehídos de bromopiridinas de los cuales se parte para la síntesis de los derivados **SII-1** – **SII-4** pueden ser susceptibles a sustitución nucleofílica vía mecanismo $S_{RN}1$.⁷⁰ Además, estos aldehídos *per se* son inestables y se pueden descomponer con facilidad según datos de estabilidad del proveedor.⁷¹ La inestabilidad se comprueba fácilmente de forma experimental mediante TLC dado que a presión atmosférica y temperatura ambiente el aldehído se descompone en periodos que van desde 12 h a 6 días.

Por otro lado, existen descripciones que 2-bromopiridinas fotoestimuladas en presencia de nucleófilos sufren reacciones de sustitución nucleofílica vía un mecanismo $S_{RN}1$. Estudiando la reactividad de 2-halopiridinas frente a enolatos se observó el siguiente orden: 2-bromopiridinas > 2-cloropiridinas > 2-fluoropiridinas; a su vez los isómeros de posición de bromopiridinas exhiben reactividad decreciente en el orden 2-bromopiridinas > 3-bromopiridinas > 4-bromopiridinas.⁷² Se ha descrito, además, preferencia en experimentos de competencia por enolatos terciarios sobre primarios, así como también por sales de bases de potasio versus otros metales alcalinos. Estos datos bibliográficos afirman la hipótesis de que el compuesto **SII-1A** (figura 3.5) sea el resultado de una $S_{RN}1$ intramolecular seguido de un re-arreglo a nivel del carbono 2 de la piridina, pero esta afirmación necesita mayores estudios. Esfuerzos en este sentido no fueron realizados. Se ha observado además reacciones de bromopiridinas con diversos tioles de bajo peso molecular que da indicio de que esta reacción puede tener relevancia *in vivo* con –SH de Cys.^{73,74}

⁷⁰ Peñeñory, A.B.; Rossi, R.A.; The photostimulated $S_{RN}1$ process reaction of haloarenes with carboanions. *CRC Handbook of organic photochemistry and photobiology*, CRC Press, 2003, 2^{da} Ed., On line, Vol. 1-2, Cap. 47: 47-1-47-10.

⁷¹ A) Product number 644102, B) Product number 632147, C) Product Number 525693. *Material safety data sheet*, Sigma Aldrich, Saint Louis, USA.

⁷² Komin, A.P.; Wolfe, J.F. The $S_{RN}1$ Mechanism in heteroaromatic nucleophilic substitution. Photostimulated reactions of halopyridines with ketone enolates. *J. Org. Chem.* 1977, 42 (14): 2481-2486.

⁷³ Kondo, S.; Nakanishi, M.; Tsuda, K. Nucleophilic substitution of halopyridines by benzenethiolate anion via a radical chain mechanism. *J. Heterocycl. Chem.* 1984, 21: 1243–1244.

⁷⁴ Bhagwat, A.; Campi, E.M.; Potdar, M.K.; Jackson, W.R.; Hearn, M.T.W. Efficient nucleophilic substitution of halopyridines using ethanol as solvent with microwave heating: synthesis of 2-aminoethylsulfanylpipridines. *Green Chem. Lett. Rev.* 2012, 1: 1-7.

Considerando lo anteriormente mencionado es de esperar que el 5-bromo-3-piridincarboxaldehído sea el aldehído menos susceptible de sufrir $S_{RN}1$ de los tres bromopiridincarboxaldehídos empleados en este trabajo de tesis y se evidencia además que es el menos lábil a T amb y no protegido de la luz. La síntesis de los compuestos **SII-3** y **SII-4** concuerda con lo predicho ya que se obtienen sin productos secundarios en cantidad considerable cuando se utiliza *t*-BuOK en THF a reflujo, aunque los rendimientos son de bajos a moderados.

Los quinolin-derivados **SII-5** – **SII-9**, excepto **SII-6**, se obtienen con buenos a moderados rendimientos en las condiciones clásicas ensayadas para la serie I, NaOH en MeOH en tiempos variables de calentamiento a reflujo o temperatura ambiente. Durante la síntesis de **SII-6** se obtiene el aldol correspondiente **SII-6A**, intentos de mayores tiempos de reacción para producir la eliminación conducen a descomposición de **SII-6A** por lo que **SII-6** no se obtiene.

SÍNTESIS DE LOS DERIVADOS PERTENECIENTES A LA SERIE III

Hasta aquí las chalconas sintetizadas en esta tesis y discutidas previamente se obtuvieron por condensación aldólica de las correspondientes acetofenonas o naftofenonas con los correspondientes aldehídos aromáticos en presencia de NaOH en metanol, también se ensayaron las condiciones *t*-BuOK/THF y NaH/THF optimizadas para la obtención de los productos de la serie II. Dado la experiencia del grupo en la química de benzofuroxanos y furoxanos se preveía que no era adecuado someter a estos heterociclos a la presencia de estas bases a altas temperaturas. En este sentido se realizaron estudios preliminares de obtención de benzofuroxanil chalconas en las tres condiciones sintéticas optimizadas hasta el momento. Como se muestra en la figura 3.8, ninguna de ellas condujo a la formación del producto deseado en solución, esto está en concordancia con resultados previos obtenidos por nuestro grupo utilizando condiciones similares.⁷⁵

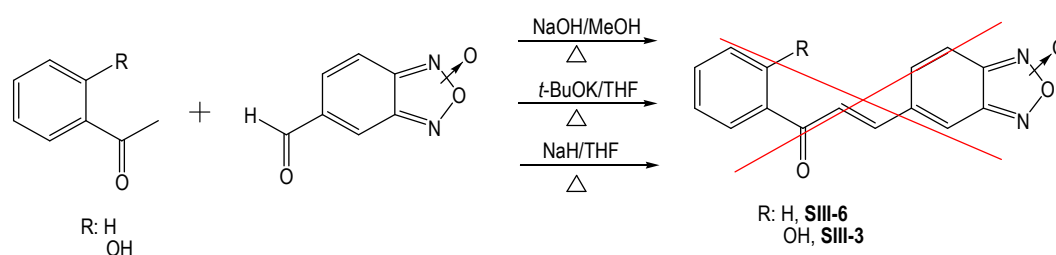


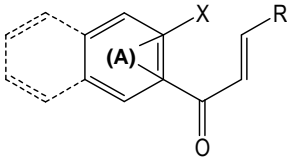
Figura 3.8. Esquema de condiciones ensayadas para la obtención de las benzofuroxanil chalconas **SIII-3** y **SIII-6** mediante condensación aldólica.

Estos estudios han demostrado que la obtención de benzofuroxanil chalconas por metodologías clásicas de condensación aldólica son infructuosas dado que se descompone el heterociclo de partida o se produce la

⁷⁵ Castro, D.; Boiani, L.; Benitez, D.; Hernández, P.; Merlino, A.; Gil, C.; Olea-Azar, C.; González, M.; Cerecetto, H.; Porcal, W. Anti-trypansomatid benzofuroxans and deoxygenated analogues: synthesis using polymer-supported triphenylphosphine, biological evaluation and mechanism of action studies. *Eur. J. Med. Chem.* 2009, 44: 5055–5065.

reducción de los productos a los benzofurazanos correspondientes. Esto puede ser explicado dada la conocida susceptibilidad a la apertura del anillo de este heterociclo por ataque nucleofílico. El sistema benzofuroxano reacciona muy fácilmente con un gran número de especies ricas en electrones como por ejemplo enolatos para dar un gran número de productos entre los que se encuentran derivados de la apertura del anillo, otros derivados del heterociclo y derivados deoxigenados.^{76,77} También existen descripciones de susceptibilidad al ataque nucleofílico del sistema furoxano, si bien es sabido su menor reactividad comparando con benzofuroxanos.^{78,79} Consecuentemente, para preparar los derivados de esta serie, furoxanil y benzofuroxanil chalconas **SIII-1 – SIII-9** (tabla 3.6), se eligió una estrategia de fase sólida utilizando bromoacetofenonas o bromoacetonaftonas disponibles comercialmente y trifenilfosfina anclada a una resina de poliestireno (PS-TPP, figura 3.9). Así, vía reacción de Wittig, se obtienen las correspondientes sales de fosfonio que tratadas con la base bis(trimetilsilil)amido de sodio ($\text{NaN}(\text{SiMe}_3)_2$) primero y condensando con los correspondientes aldehídos después se produce el concomitante clivaje de la resina vía reacción de Wittig para dar la chalcona libre, en la solución, y óxido de trifenilfosfina (PS-TPPO) anclado a resina.

Tabla 3.6. Productos obtenidos pertenecientes a los diseñados dentro de la serie III.



Derivado	anillo (A)	-X	posición carbonilo	-R
SIII-1	fenilo	-OH	-	3-metil-4-furoxanil
SIII-2	fenilo	-OH	-	4-fenil-3-furoxanil
SIII-3	fenilo	-OH	-	5-benzofuroxanil
SIII-4	fenilo	-H	-	3-metil-4-furoxanil
SIII-5	fenilo	-H	-	4-fenil-3-furoxanil
SIII-6	fenilo	-H	-	5-benzofuroxanil ^a
SIII-7	naftilo	-H	2	3-metil-4-furoxanil
SIII-8	naftilo	-H	2	4-fenil-3-furoxanil
SIII-9	naftilo	-H	2	5-benzofuroxanil

^a anteriormente llamado Q3

La estrategia de síntesis en fase sólida, aporta un aspecto novedoso químicamente y posee ciertas ventajas con respecto a la síntesis en solución. Se simplifica el aislamiento y purificación del producto de reacción ya que se

⁷⁶ Alexanian, V.; Haddadin, M. J.; Issidorides, C.H.; Nazer, N. Z. A note on the oxidative capacity of benzofurazan oxide. *Heterocycles* 1981, 16 (3): 391-398.

⁷⁷ Nazer, M.Z.; Issidorides, C.H.; Haddadin, M.J. Reactions of benzofurazan oxide with amines I: Reduction with diethylamine. *Tetrahedron* 1979, 35 (5): 681-685.

⁷⁸ Medana, C.; Ermondi, G.; Fruttero, R.; Di Stilo, A.; Ferreti, C.; Gasco, A. Furoxans as nitric oxide donors. 4-Phenyl-3-furoxancarbonitrile: thiol-mediated nitric oxide release and biological evaluation. 1994; 37 (25): 4412-4416.

⁷⁹ Boiani, M.; Cerecetto, H.; González, M.; Risso, M.; Olea-Azar, C.; Piro, O.E.; Castellano, E.E.; López de Cerain, A.; Ezpeleta, O.; Monge-Vega, A. *Eur. J. Med. Chem.* 2001, 36 (10): 771-782.

lleva a cabo mediante simples procesos de lavado y filtración que permiten eliminar el exceso de reactivos y productos secundarios, que no se han unido al soporte sólido^{80,81}

El primer paso de las síntesis involucró la formación de las sales de fosfonio soportadas en la fase polimérica, a partir de la resina de trifenilfosfina y derivados de 2-bromoacetofenona o 2-bromoacetonaftona comerciales. Se ensayaron dos condiciones diferentes según se resumen en tabla 3.7, ambas rinden excelentes rendimientos por ello se eligió la condición 2, dado que se realiza en menor tiempo.

Tabla 3.7. Condiciones ensayadas para la síntesis de la sal **SIII-S1** (ver figura 3.9).

Condición	T (°C)	RM ^a	t (h)	R (%)
1	T. amb	3	48	98
2	65	3	12	99

^a RM: relación molar (bromocetona:resina).

Los compuestos **SIII-1** – **SIII-9** se obtienen con muy buenos rendimientos que van desde 52 a 100 % y se evidencia mediante estudios de ¹H-RMN que corresponden a los isómeros geométricos *E*. Las chalconas **SIII-2**, **SIII-5** y **SIII-8** se obtienen con rendimientos cercanos a 100 %. Estos se pueden explicar por la electrofilia aumentada del 4-fenilfuroxan-3-carboxaldehído, que es influenciada por el efecto inductivo – I causado por la cercanía del grupo *N*-óxido al carbono carbonílico.

Por otra parte la síntesis de las naftilchalconas de esta serie, **SIII-7** – **SIII-9**, son las que necesitan de mayores tiempos de reacción, lo que probablemente sea consecuencia del mayor impedimento estérico del iluro para aproximarse a los aldehídos correspondientes.

Como forma de evaluar la relevancia de la función *N*-óxido en la actividad biológica de estos derivados, se prepara un análogo libre de dicha funcionalidad. Así, la benzofurazanil chalcona **SIII-5R** (figura 3.10) se obtuvo a partir del correspondiente benzofuroxano **SIII-5** utilizando resina de trifenilfosfina como agente reductor. Las dos condiciones ensayadas brindan excelentes rendimientos, mayores al 90 %. La *N*-deoxigenación de heterociclos por derivados de fósforo (III) es bien conocida y parece involucrar ataque nucleofílico del átomo de oxígeno, al fósforo que expande octeto, seguido de ruptura del enlace N-O con el concomitante cambio de estado de oxidación del átomo de fósforo.^{75,82}

⁸⁰ Blaney, P.; Grigg, R.; Sridharan, V. Traceless solid-phase organic synthesis. *Chem. Rev.* 2002, 102: 2676-2624.

⁸¹ Marthshall, G. Solid-phase synthesis: a paradigm shift. *J. Peptide Sci.* 2003, 9: 534-544.

⁸² Albini, A.; Pietra, S. *Heterocyclic N-oxides*, CRC Press, 2000, 1^{ra} Ed., Boston, USA, Cap. 4: 111-271.

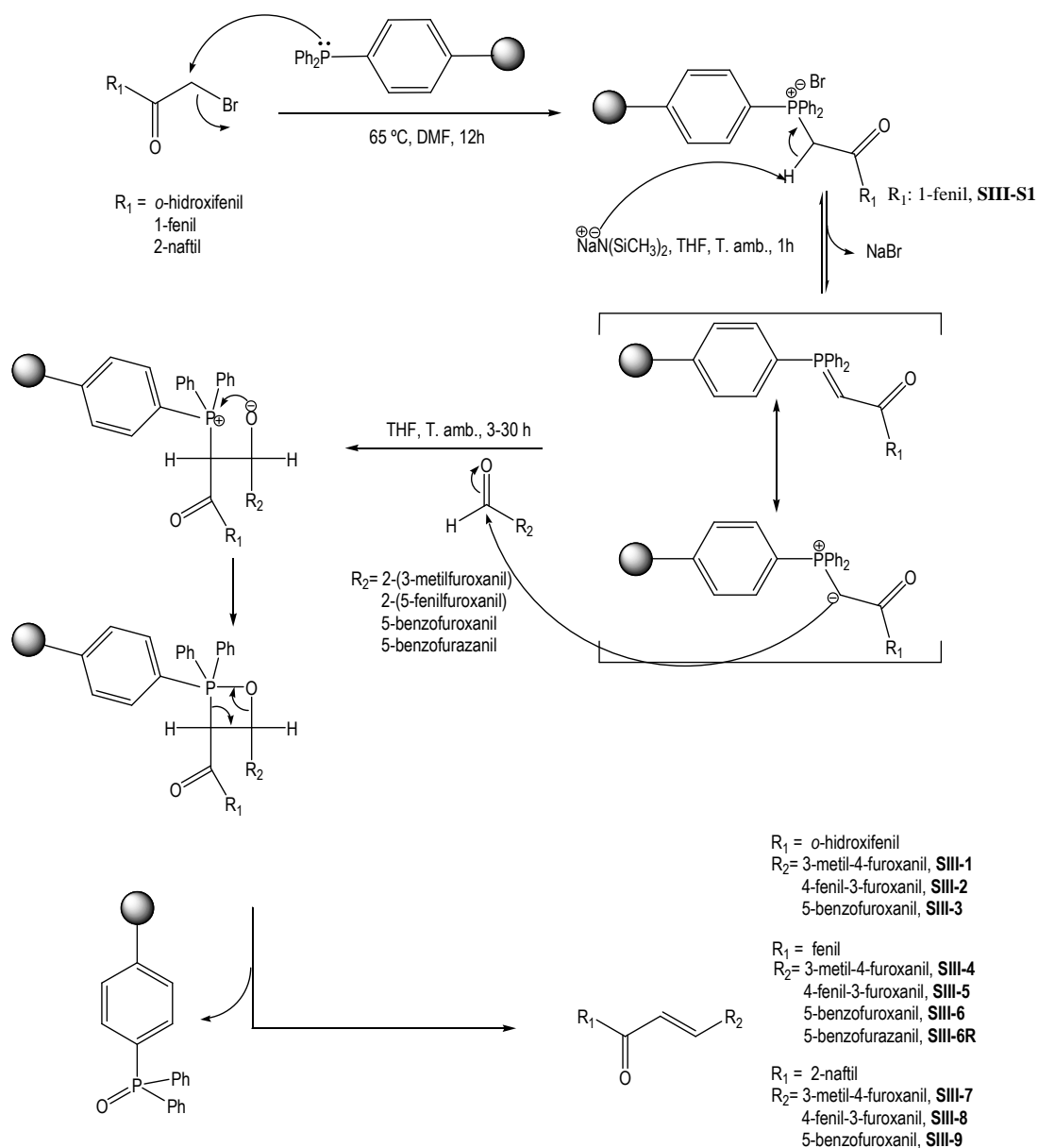


Figura 3.9. Esquema y mecanismo de la reacción de Wittig utilizando trifenílfosfina anclada a una resina de poliestireno (PS-TTP) para la obtención de los compuestos **SIII-1** – **SIII-9**.

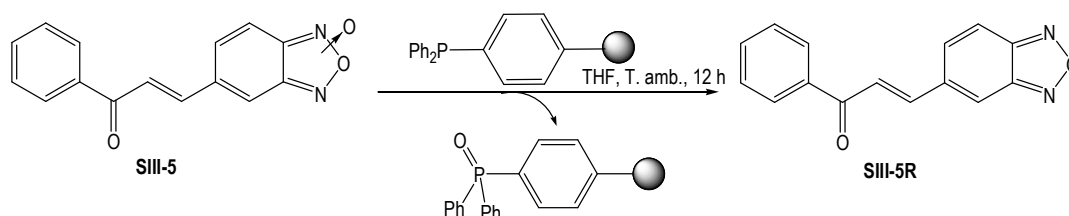


Figura 3.10. Síntesis de la benzofurazanil chalcona **SIII-5R** utilizando PS-TTP.

MATERIALES Y MÉTODOS QUÍMICOS

CONSIDERACIONES GENERALES

Aquí se detallan los procedimientos experimentales y el análisis espectroscópico de los productos, intermedios, secundarios y finales, obtenidos.

Todos los reactivos provienen de fuentes comerciales (Sigma-Aldrich, Janssen, Merck, Fluka, entre otros) y se utilizan sin purificar, excepto que se indique de otra forma. Los siguientes disolventes se secan y se destilan antes de su uso, como se indica a continuación. AcOEt y hexanos se secan con MgSO_4 y se destilan. THF y éter etílico se tratan con CaH_2 para eliminar peróxidos, se secan por calentamiento a reflujo sobre Na (usando benzofenona como indicador) hasta persistencia de color azul y luego se destilan. CH_2Cl_2 se seca por calentamiento a reflujo sobre P_2O_5 y luego se destila. Acetona se trata con KMnO_4 a reflujo hasta persistencia de color violeta, se filtra, se seca por calentamiento a reflujo sobre K_2CO_3 anhidro y luego se destila. MeOH anhidro se obtiene a partir de MeOH absoluto comercial por tratamiento con $\text{Mg} - \text{I}_2$ y destilación.⁸³

Los grados de avance de todas las reacciones fueron monitoreadas por cromatografía en capa fina (TLC) usando placas de poliéster recubiertas con sílicagel (Alugram® Sil G/UV₂₅₄) o con óxido de aluminio, (Poligram® Alox N/UV₂₅₄), ambas con indicador fluorescente, usando diferentes sistemas de disolventes. Las fases móviles utilizadas han sido mezclas en distintas proporciones de AcOEt : EP, Et₂O : EP y CH_2Cl_2 : MeOH. Los cromatogramas se revelan por alguno de los siguientes métodos:

- Exposición a luz UV (254 nm).
- Exposición a vapores de I_2 .
- Asperjado con una mezcla de EtOH: H_2SO_4 : anisaldehído (95:4:1) y posterior quemado.
- Asperjado con reactivo de Brady.

Los productos se purifican mediante cromatografía en columna (CC) sobre sílica gel (Merck, 60–230 mesh), usando hexanos como eluyente inicial, seguido de un gradiente de disolventes adecuado (EP → AcOEt:EP).

Los espectros de ^1H -RMN y ^{13}C -RMN se realizan en un equipo BRUKER DPX-400 (400 MHz), empleando tetrametilsilano como referencia interna. Los desplazamientos químicos vienen dados en partes por millón (ppm) y las constantes de acoplamiento (J) vienen dadas en hercios (Hz). En el caso de los espectros de ^{13}C -RMN realizados en CDCl_3 el pico central del triplete de CDCl_3 se asigna como 77.0 ppm. Las asignaciones de H y C se realizan en base a experimentos de 2D-RMN (^1H - ^1H -COSY, ^1H - ^{13}C -HSQC y ^1H - ^{13}C -HMBC). Para los experimentos de HMBC y HSQC se utilizaron las secuencias de pulsos disponibles en el software del equipo. Se utiliza cloroformo deuterado como disolvente. Los desplazamientos químicos se expresan en ppm y las multiplicidades se designan como: singulete (s), doblete (d), triplete (t), multiplete (m), doble doblete (dd) y doble triplete (dt).

Los espectros de masa se realizan en un espectrómetro de masas SHIMADZU GC-MS QP 1100 EX. La ionización de la muestra es por impacto electrónico a 70 eV por inyección directa.

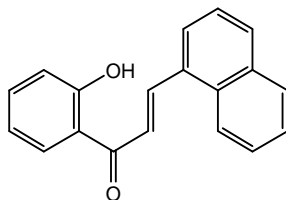
⁸³ Perrin, D.D.; Armarego, W.L.F. *Purification of Laboratory Chemicals*, Butterworth-Heinemann, 1996, 4^{ta} Ed., Oxford, UK.

SERIE I

Procedimiento General de Síntesis de Chalconas de Serie I.⁶⁵

A una solución del aldehído aromático correspondiente (1 eq.) en MeOH absoluto (12 mL/mmol), se le agrega NaOH (3 eq). La mezcla se mantiene con agitación vigorosa hasta total disolución. Se agrega luego la correspondiente aceto- o naftofenona (1eq.). La mezcla de reacción se calienta a reflujo hasta evidenciarse consumo de reactivos (3-15h). Luego de este tiempo la mezcla se neutraliza con HCl (10%, v/v) y si el producto precipita (fenoles) se filtra y lava con EP frío. El sólido se seca sobre sílicagel y su pureza se chequea cromatográficamente y por ¹H-RMN. Según se indica particularmente se purifica por CC, recristalización o se utiliza el producto así obtenido directamente. En caso de no precipitar sólido luego de la neutralización, se extrae con AcOEt (3 × 50 mL). Las capas orgánicas se secan con Na₂SO₄ anhidro, se evapora el disolvente a presión reducida y el producto se purifica mediante CC.

SI-1: (E)-1-(2-hidroxifenil)-3-(naftalen-1-il)-2-propenona



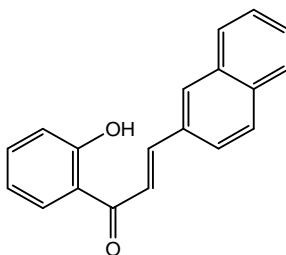
¹H-RMN (CDCl₃, 400 MHz), δ: 6.99 (1H, dt, J₁ = 1.1 Hz, J₂ = 8.1 Hz); 7.09 (1H, dd, J₁ = 0.9 Hz, J₂ = 8.4 Hz); 7.52-7.66 (4H, m); 7.77 (1H, d, J = 15.2 Hz); 7.96 (4H, m); 8.30 (1H, d, J = 8.4 Hz), 8.81 (1H, d, J = 15.2 Hz); 12.87 (1H, s).

¹³C-RMN (HSQC-HMBC) (CDCl₃, 100MHz), δ: 119.1; 119.3; 120.5; 123.2; 123.8; 125.8; 125.8; 126.8; 127.6; 129.2; 130.2; 131.6; 132.2; 132.5; 134.2; 136.9; 142.8; 164.1; 194.0.

EM (m/z), (%): 274 (M⁺, 100), 255 (11), 228 (17), 155 (43), 141 (27), 121 (50), 92 (14).

Sólido amarillo, p.f. (°C): 112.0-114.2, R (%): 65, recristalizado de EtOH.

SI-2: (E)-1-(2-hidroxifenil)-3-(naftalen-2-il)-2-propenona



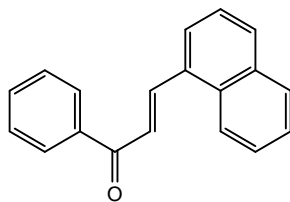
¹H-RMN (CDCl₃, 400 MHz), δ: 7.00 (1H, dt, J₁ = 1.0 Hz, J₂ = 8.0 Hz); 7.08 (1H, dd, J₁ = 0.9 Hz, J₂ = 8.4 Hz); 7.52-7.59 (3H, m); 7.78 (1H, d, J = 15.4 Hz); 7.82 (1H, dd, J₁ = 1.4 Hz, J₂ = 8.6 Hz); 7.87-7.93 (3H, m); 8.00 (1H, dd, J₁ = 1.4 Hz, J₂ = 8.0 Hz); 8.07, (1H, s); 8.10 (1H, d, J = 15.4 Hz); 12.95 (1H, s).

¹³C-RMN (HSQC-HMBC) (CDCl₃, 100MHz), δ: 118.7; 118.9; 120.0; 120.1; 123.7; 126.9; 127.7; 127.9; 128.8; 128.9; 129.7; 131.2; 132.1; 133.4; 134.6; 136.5; 145.6; 163.7; 193.7.

EM (m/z), (%): 273 (M⁺-1, 67), 257 (4), 141 (21), 121 (100).

Sólido amarillo, p.f. (°C): 114-116, R (%): 77.

SI-3: (E)-1-fenil-3-(naftalen-1-il)-2-propenona



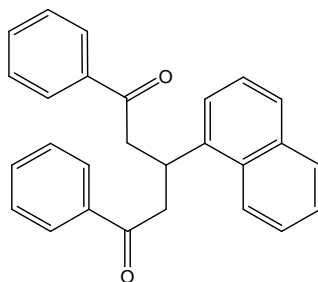
^1H -RMN (CDCl_3 , 400 MHz), δ : 7.62 (7H, m); 7.94 (3H, m), 8.12 (2H, d, $J = 6.7$ Hz); 8.29 (1H, d, $J = 7.6$ Hz); 8.70 (1H, d, $J = 15.3$).

^{13}C -RMN (HSQC-HMBC) (CDCl_3 , 100MHz), δ : 123.9; 125.2; 125.5; 126.7; 127.4; 129.0; 129.0; 129.1; 129.2; 131.2; 132.2; 132.8; 133.2; 134.2; 138.7; 145.3; 190.7.

EM (m/z), (%): 258 (M^{+} 100), 229 (18), 181 (17), 152 (46), 128(19), 105 (55), 77 (33), 51 (7).

Sólido amarillo pálido, p.f. (°C): 82.8-83.5. R (%): 59.

SI-3D: 1,5-difenil-3-(naftalen-1-il)-1,5-pentanodiona



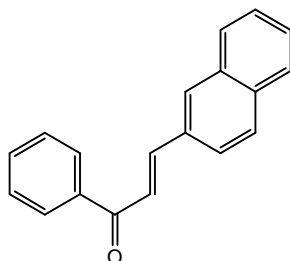
^1H -RMN (CDCl_3 , 400 MHz), δ : 3.6 (2H, dd, $J_1 = 6.4$ Hz, $J_2 = 16.9$ Hz); 3.7 (2H, dd, $J_1 = 7.3$ Hz, $J_2 = 16.9$ Hz); 5.1 (1H, dd, $J_1 = 6.7$ Hz, $J_2 = 13.4$ Hz); 7.42 (3H, m); 7.53 (6H, m); 7.74 (2H, d, $J = 8.2$), 7.88 (1H, d, $J = 7.7$ Hz); 7.97 (4H, d, $J = 7.4$ Hz); 8.27 (1H, d, $J = 8.3$).

^{13}C -RMN (HSQC-HMBC) (CDCl_3 , 100MHz), δ : 31.3, 43.9, 44.4, 109.7, 123.5, 123.6, 131.4, 127.9, 120.0 – 140.1 (7 C), 140.1, 198.9.

EM (m/z), (%): 378 (M^{+} 14), 259 (100), 241 (14), 153 (23), 105 (99), 77 (49).

Sólido amarillo, p.f. (°C): 75.1-78.0. R (%): 15.

SI-4: (E)-1-fenil-3-(naftalen-2-il)-2-propenona



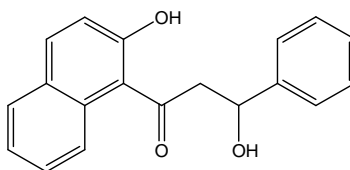
^1H -RMN (CDCl_3 , 400 MHz), δ : 7.55 (3H, m); 7.62 (1H, m); 7.67 (1H, d, $J = 15.7$ Hz); 7.82 (1H, dd, $J_1 = 1.6$ Hz, $J_2 = 8.6$ Hz); 7.89 (3H, m); 8.01 (1H, d, $J = 15.7$), 8.06 (1H, d, $J = 8.9$ Hz); 8.09 (1H, d, $J = 7.1$).

^{13}C -RMN (HSQC-HMBC) (CDCl_3 , 100MHz), δ : 122.7; 124.1; 127.2; 127.8; 128.2; 128.9; 129.1; 129.2; 131.0; 132.8; 133.2; 133.8; 134.8; 138.8; 145.3; 190.9.

EM (m/z), (%): 258 (M^{+} , 100), 229 (24), 181 (22), 152 (39), 128 (21), 105 (19), 77 (25).

Sólido amarillo pálido, p.f. (°C): 156.1-158.2, R (%): 79.

SI-5A: 3-hidroxi-1-(2-hidroxinaftalen-1-il)-3-fenilpropanona



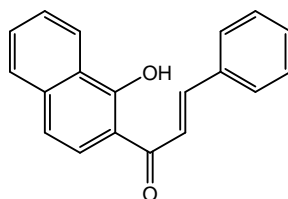
^1H -RMN (CDCl_3 , 400 MHz), δ : 3.02 (1H, d, J = 16.0 Hz); 3.24 (1H, J = 16.0 Hz), 5.63 (1H, d, J = 13.2 Hz); 7.22 (1H, d, J = 8.4 Hz); 7.49-7.55 (6H, m); 7.68 (1H, d, J = 7.2); 7.80 (1H, d, J = 7.2 Hz); 7.98 (1H, d, J = 8.4 Hz); 9.53 (1H, d, J = 8.0 Hz), 12.60 (1H, s); 13.45 (1H, s).

^{13}C -RMN (HSQC-HMBC) (CDCl_3 , 100MHz), δ : 46.1; 80.0; 113.0; 119.3; 125.3; 126.3, 126.6; 128.8; 129.2; 129.3; 129.7; 130.1; 131.9; 138.0; 139.0; 164.1; 193.3.

EM (m/z), (%): 292 (M^{+} , 2), 274 (63), 170 (100), 142 (30).

Sólido amarillo, p.f. (°C): 102.1-105.0. R (%): 24.

SI-6: (E)-1-(1hidroxinaftalen-2-il)-3-fenil-2-propenona



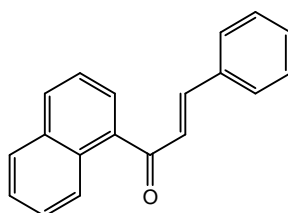
^1H -RMN (CDCl_3 , 400 MHz), δ : 7.34 (1H, d, J = 8.87 Hz); 7.47 (3H, m), 7.57 (1H, dt, J_1 = 8.18 Hz, J_2 = 1.07 Hz); 7.67 (1H, dt, J_1 = 1.2 Hz, J_2 = 7.5 Hz); 7.73 (2H, m); 7.78 (1H, d, J = 15.4); 7.80 (1H, d, J = 7.1 Hz); 7.88 (1H, d, J = 8.9 Hz); 8.02 (1H, d, J = 15.5 Hz); 8.53 (1H, d, J = 8.3); 14.03 (1H, s).

^{13}C -RMN (HSQC-HMBC) (CDCl_3 , 100MHz), δ : 113.9; 118.6; 121.0; 124.3; 124.9; 125.9; 126.4; 127.8; 129.1; 129.4; 130.6; 131.2; 135.2; 137.8; 145.5; 164.8; 193.7.

EM (m/z), (%): 274 (M^{+} , 35), 197 (6), 170 (100), 142 (3), 114 (45).

Sólido naranja, p.f. (°C): 129.1-129.4. R (%): 52, recristalizado de EtOH.

SI-7: (E)-3-fenil-1-(naftalen-1-il)-2-propenona



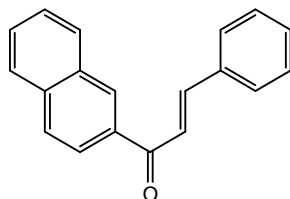
^1H -RMN (CDCl_3 , 400 MHz), δ : 7.34 (1H, d, J = 16.0 Hz); 7.43 (2H, m), 7.51-7.65 (5H, m); 7.64 (1H, d, J = 16.0 Hz); 7.80 (1H, dd, J_1 = 1.2 Hz, J_2 = 6.8 Hz); 7.91 (1H, dd); 7.97 (1H, dd, J_1 = 1.2 Hz, J_2 = 7.2 Hz); 8.0 (1H, d, J = 8.4 Hz); 8.78 (1H, d, J = 8.0).

^{13}C -RMN (HSQC-HMBC) (CDCl_3 , 100MHz), δ : 124.4; 124.6; 125.7; 126.0; 126.5; 127.1, 127.2; 127.5; 128.1; 128.5; 128.8; 129.0; 130.8; 131.7; 133.1; 146.1; 201.9.

EM (m/z), (%): 258 (M^{+} , 100), 229 (36), 181 (25), 127 (30), 103 (43), 77 (34).

Aceite amarillo, R (%): 73.

SI-8: (E)-3-fenil-1-(naftalen-2-il)-2-propenona



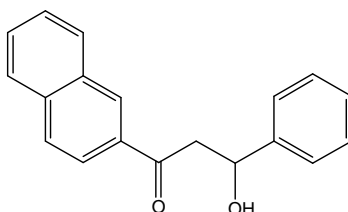
^1H -RMN (CDCl_3 , 400 MHz), δ : 7.48 (3H, m); 7.64 (2H, m); 7.73 (2H, m); 7.74 (1H, d, $J = 15.0$ Hz); 7.94 (3H, m); 8.03 (1H, d, $J = 8.0$), 8.12 (1H, dd, $J_1 = 8.0$ Hz, $J_2 = 12.0$ Hz); 8.58 (1H, s).

^{13}C -RMN (HSQC-HMBC) (CDCl_3 , 100MHz), δ : 122.1; 124.5; 126.8; 127.9; 128.4; 128.5; 128.6; 129.0; 129.6; 130.0; 131.0; 132.6; 135.0; 135.5; 135.6; 144.9; 190.4.

EM (m/z), (%): 258 (M^{+} , 100), 229 (23), 155 (78), 127 (66), 103 (18), 77 (18).

Sólido amarillo, p.f. ($^{\circ}\text{C}$): 106.1-109.1, R (%): 62.

SI-8A: 3-hidroxi-3-fenil-1-(naftalen-2-il)propanona



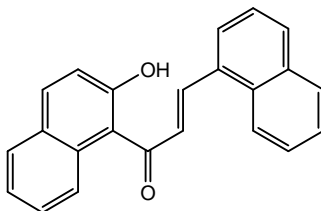
^1H -RMN (CDCl_3 , 400 MHz), δ : 3.55 (1H, dd, $J_1 = 7.2$ Hz, $J_2 = 16.8$ Hz); 3.72 (1H, dd, $J_1 = 7.2$ Hz, $J_2 = 16.8$ Hz); 4.23 (1H, t, $J_1 = 7.2$ Hz, $J_2 = 14.4$ Hz); 7.21 (1H, m); 7.31-7.39 (3H, m); 7.56 (1H, dd, $J_1 = 1.2$ Hz, $J_2 = 6.8$ Hz); 7.60 (1H, dd, $J_1 = 1.2$ Hz, $J_2 = 5.6$ Hz); 7.63 (1H, dd, $J_1 = 1.2$ Hz, $J_2 = 6.8$ Hz); 7.89 (1H, d, $J = 4.4$ Hz); 7.91 (1H, d, $J = 5.6$ Hz); 8.40 (1H, d, 8.0 Hz); 8.05 (1H, dd, $J_1 = 1.6$ Hz, $J_2 = 8.8$ Hz), 8.54 (1H, s).

^{13}C -RMN (HSQC-HMBC) (CDCl_3 , 100MHz), δ : 37.6; 45.1; 123.9; 126.8; 127.4; 127.8; 128.2; 128.5; 128.7; 129.7; 130.0; 132.5; 134.7; 135.5; 135.6; 143.9; 198.6.

EM (m/z), (%): 277 ($M^{+} + 1$, 11), 258 (100), 229 (34), 155 (78), 127 (75), 105 (39), 77 (37).

Sólido color marfil, p.f. ($^{\circ}\text{C}$): 128.7-131.8, R (%): 19.

SI-9: (E)-1-(2-hidroxinaftalen-1-il)-3-(naftalen-1-il)-2-propenona



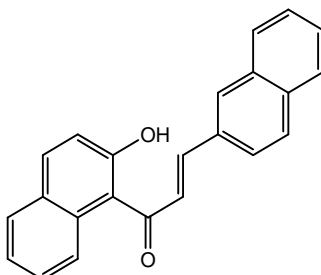
^1H -RMN (CDCl_3 , 400 MHz), δ : 7.25 (1H, d, $J = 8.9$ Hz); 7.44 (1H, t, $J_1 = 0.8$ Hz, $J_2 = 7.9$ Hz); 7.60 (5H, m); 7.86 (1H, d, $J = 15.9$ Hz); 7.90 (5H, m); 8.15 (1H, d, $J = 8.6$), 8.36 (1H, d, $J = 8.4$ Hz); 8.8 (1H, d, $J = 15.4$); 12.66 (1H, s).

^{13}C -RMN (HSQC-HMBC) (CDCl_3 , 100MHz), δ : 116.3; 119.9; 123.9; 124.4; 125.7; 125.8; 125.9; 126.8; 127.5; 128.3; 129.1; 129.3; 129.7; 129.9; 131.4; 132.0; 132.3; 132.5; 134.2; 137.3; 140.3; 163.3; 194.8.

EM (m/z), (%): 324 ($\text{M}^{+\bullet}$, 76), 296 (10), 197 (12), 186 (19), 171 (70), 154 (100), 141 (43), 128 (27), 115 (32).

Sólido amarillo, p.f. ($^{\circ}\text{C}$): 98.1-101.2, R (%): 74.

SI-10: (E)-1-(2-hidroxinaftalen-1-il)-3-(naftalen-2-il)-2-propenona



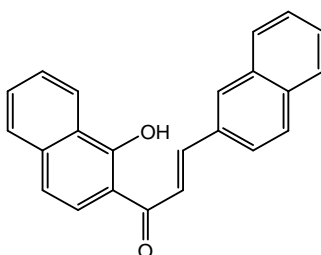
^1H -RMN (CDCl_3 , 400 MHz), δ : 7.24 (1H, d, J = 8.9 Hz); 7.45 (1H, dt, J_1 = 0.9 Hz, J_2 = 7.9 Hz); 7.58 (4H, m); 7.63 (1H, d, J = 15.6 Hz); 7.74 (1H, dd, J_1 = 1.4, J_2 = 8.6); 7.88 (4H, m); 7.95 (1H, d, J = 9.0); 8.07 (1H, s); 8.11 (1H, d, J = 15.6 Hz); 12.63 (1H, s).

^{13}C -RMN (HSQC-HMBC) (CDCl_3 , 100MHz), δ : 115.0-140.0 (20 C), 143.4, 164.1, 194.0.

EM (m/z), (%): 324 ($\text{M}^{+\bullet}$, 57), 171 (14), 154 (100), 141 (17).

Sólido amarillo-amarronado, p.f. ($^{\circ}\text{C}$): 126.0-129.0, R (%): 59.

SI-11: (E)-1-(1-hidroxinaftalen-2-il)-3-(naftalen-2-il)-2-propenona



^1H -RMN (CDCl_3 , 400 MHz), δ : 7.29 (1H, d, J = 9.0 Hz); 7.34 (1H, d, J = 8.9 Hz); 7.51-7.69 (4H, m); 7.86 (1H, d, J = 15.3 Hz); 7.75-7.98 (4H, m); 8.09 (1H, s); 8.16 (1H, d, J = 15.4 Hz); 8.49, (1H, d, J = 8.2 Hz); 8.54, (1H, d, J = 8.3 Hz); 14.04 (1H, s).

^{13}C -RMN (HSQC-HMBC) (CDCl_3 , 100MHz), δ : 115.0-140.0 (20 C), 145.5, 164.9, 192.6.

EM (m/z), (%): 324 ($\text{M}^{+\bullet}$, 42), 294 (10), 186 (60), 171 (100), 154 (87), 127 (63), 115 (50), 77 (15).

Sólido naranja, p.f. ($^{\circ}\text{C}$): 115.1-118.0. R (%): 61.

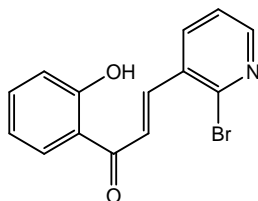
SERIE II

Procedimiento General de Síntesis de Chalconas de serie II (SI-1 – SI-4)⁶⁵

Una solución en agitación constante de *o*-hidroxiacetofenona o 1-hidroxi-2-acetonaftona (1 eq.) y *t*-BuOK (1 eq.) se calienta a reflujo de THF anhidro (2.5 mL/mmol), durante 10 minutos. Pasado este tiempo se deja enfriar hasta 40 $^{\circ}\text{C}$ y se agrega en porciones (gota a gota, durante 15 minutos), bajo atmósfera de N_2 y con agitación vigorosa, desde un embudo con ecualizador, una solución del bromopiridincarbaldéido correspondiente (1 eq.) en THF anhidro (2.5 mL/mmol). Se calienta a reflujo hasta consumo del aldehído de partida y se agrega a la

mezcla 0.3 eq. más de éste, en iguales condiciones. Consumido el aldehído, se deja enfriar, se acidula con HCl (25 %, v/v) y se extrae con AcOEt (3 × 50 ml). Las capas orgánicas combinadas se lavan con agua hasta neutralidad (3 × 50 mL), con solución de NaHCO₃ (10%, v/v) (50 mL) y se secan con Na₂SO₄ anhidro. Se evapora el disolvente a presión reducida y el sólido obtenido se purifica por CC.

SII-1: (E)-3-(2-bromopiridin-3-il)-1-(2-hidroxifenil)-2-propenona



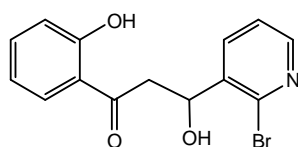
¹H-RMN (CDCl₃, 400MHz), δ: 6.97 (2H, m); 7.08 (1H, d, J = 8.3 Hz), 7.39 (1H, dd, J₁ = 4.7 Hz, J₂ = 7.7 Hz); 7.55 (1H, dt, J₁ = 1.4 Hz, J₂ = 8.4 Hz); 7.62 (1H, d, J = 7.7 Hz); 7.90 (1H, dd, J₁ = 1.2 Hz, J₂ = 8.1 Hz); 8.02 (1H, dd, J₁ = 1.8 Hz, J₂ = 7.7 Hz); 8.16 (1H, d, J = 15.5 Hz); 12.57 (1H, s).

¹³C-RMN (HSQC-HMBC) (CDCl₃, 100MHz), δ: 119.3; 119.4; 120.1; 123.5; 125.4; 130.1; 132.9; 136.2; 137.3; 139.2; 142.0, 151.4, 164.2, 193.3.

EM (*m/z*), (%): 305/303 (M^{••} 11), 224 (100), 167, (11), 147 (64) 121 (31), 102 (22), 93 (12), 76 (13), 65 (23), 51 (11).

Sólido amarillo, p.f. (°C): 131.0-133.1, R (%): 55.

SII-1A: 3-(2-bromopiridin-3-il)-3-hidroxi-1-(2-hidroxifenil)propanona



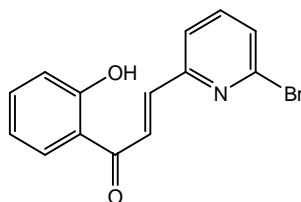
¹H-RMN (CDCl₃, 400MHz), δ: 3.14 (1H, dd, J₁ = 4.2 Hz, J₂ = 17.0 Hz); 3.21 (1H, dd, J₁ = 11.4 Hz, J₂ = 17.0 Hz); 5.63 (1H, dd, J₁ = 4.2 Hz, J₂ = 11.4 Hz); 7.10 (1H, d, J = 8.1 Hz); 7.31 (1H, m); 7.53 (1H, m); 7.62 (1H, d, J = 7.8 Hz); 7.79 (1H, dt, J₁ = 1.8 Hz, J₂ = 7.8 Hz); 7.95 (1H, dd, J₁ = 1.7 Hz, J₂ = 7.8 Hz); 8.64 (1H, d, J = 4.5 Hz); 12.27 (1H, s), 12.80 (1H, s).

¹³C-RMN (HSQC-HMBC) (CDCl₃, 100MHz), δ: 42.2; 80.2; 118.5; 121.3; 121.6; 122.1; 123.8; 127.4; 136.5; 137.5; 149.8; 158.0; 161.4; 192.0.

EM (*m/z*), (%): 321/323 (M^{••} 8), 224 (10), 196 (30) 167, (96), 147 (15) 121 (80), 92 (100).

Sólido amarillo, p.f. (°C): 145.1-147.3, R (%): 24.

SII-2: (E)-3-(6-bromopiridin-2-il)-1-(2-hidroxifenil)-2-propenona



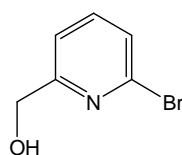
^1H -RMN (CDCl_3 , 400MHz), δ : 7.00 (1H, dt, $J_1 = 1.0$ Hz, $J_2 = 8.1$ Hz); 7.10 (1H, dd, $J_1 = 0.9$ Hz, $J_2 = 8.1$ Hz); 7.44 (1H, d, $J = 7.4$ Hz); 7.54 (2H, m); 7.63 (1H, t, $J_1 = 7.7$, $J_2 = 15.4$ Hz); 7.73 (1H, d, $J = 15.0$ Hz); 8.05 (1H, $J_1 = 1.5$, $J_2 = 8.1$ Hz); 8.27 (1H, d, $J = 15.0$ Hz), 12.66 (1H, s).

^{13}C -RMN (HSQC-HMBC) (CDCl_3 , 100MHz), δ : 118.9, 119.4, 120.4, 124.9, 126.1, 129.9, 130.8, 137.3, 139.5, 141.6, 143.2, 154.4, 164.9, 194.2.

EM (m/z), (%): 305/303 (M^{+} 58), 276/274 (12), 258 (48), 196 (61), 147 (100), 121 (31), 102 (23), 93 (12), 76 (21), 65 (20), 51 (9).

Sólido amarillo, p.f. ($^{\circ}\text{C}$): 92.2-94.0. R (%): 29.

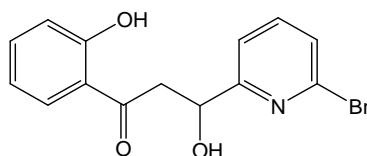
SII-2C: 2-bromo-6-hidroximetilpiridina



^1H -RMN (CDCl_3 , 400MHz), δ : 3.09 (1H, s); 4.77 (2H, s); 7.30 (1H, d, $J = 7.6$ Hz); 7.41 (1H, d, $J = 7.8$ Hz); 7.57 (1H, t, $J_1 = 7.7$, $J_2 = 15.4$ Hz).

Sólido amarillo, pf ($^{\circ}\text{C}$): 36.3-42.4. R(%): 20.

SII-2A: 3-(6-bromopiridin-2-il)-3-hidroxi-1-(2-hidroxifenil)propanona

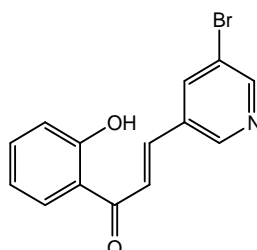


^1H -RMN (CDCl_3 , 400MHz), δ : 3.48 (1H, dd, $J_1 = 5.7$ Hz, $J_2 = 17.5$ Hz); 3.70 (1H, dd, $J_1 = 7.8$ Hz, $J_2 = 17.5$ Hz); 4.27 (1H, m); 6.92 (1H, dt, $J_1 = 1.1$ Hz, $J_2 = 8.2$ Hz); 6.98 (1H, dd, $J_1 = 1.1$ Hz, $J_2 = 8.2$ Hz); 7.31 (1H, d, $J = 7.8$ Hz); 7.36 (1H, d, $J = 7.6$ Hz); 7.45-7.50 (2H, m); 7.82 (1H, dd, $J_1 = 1.5$ Hz, $J_2 = 8.0$ Hz); 12.12 (1H, s); 12.70 (1H, s).

^{13}C -RMN (HSQC-HMBC) (CDCl_3 , 100MHz), δ : 37.4; 42.9; 118.5; 119.0; 123.0; 126.4; 130.1; 136.6; 138.9; 141.8; 162.4; 163.8; 204.2.

Sólido amarillo, pf ($^{\circ}\text{C}$): 111.5-114.3, R(%): ND.

SII-3: (E)-3-(5-bromopiridin-3-il)-1-(2-hidroxifenil)-2-propenona



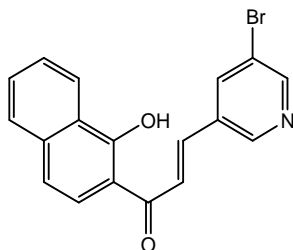
^1H -RMN (CDCl_3 , 400MHz), δ : 7.99 (1H, $J_1 = 8.0$ Hz, $J_2 = 15.2$ Hz); 7.08 (1H, d, $J = 8.3$ Hz); 7.56 (1H, dt, $J_1 = 1.4$ Hz, $J_2 = 8.4$ Hz); 7.73 (1H, d, $J = 15.6$ Hz); 7.85 (1H, d, $J = 15.6$ Hz); 7.92 (1H, d, $J = 8.1$ Hz); 8.14 (1H, d, $J = 1.8$ Hz); 8.74 (1H, s); 8.81 (1H, s), 12.57 (1H, s).

^{13}C -RMN (HSQC-HMBC) (CDCl_3 , 100MHz), δ : 118.4; 119.2; 119.5; 123.9; 126.2; 130.1; 131.4; 137.2; 137.4; 140.1, 148.5, 152.7, 164.2, 193.1.

EM (m/z), (%): 305/303 (M^{+} 31), 276/274 (18), 258 (100), 196 (11), 147 (96), 121 (39), 103 (28), 77 (28), 65 (19).

Sólido amarillo, p.f. ($^{\circ}\text{C}$): 141.2-143.4, R (%): 17.

SII-4: (E)-3-(5-bromopiridin-3-il)-1-(1-hidroxinaftalen-2-il)-2-propenona



^1H -RMN (CDCl_3 , 400MHz), δ : 7.35 (1H, d, J = 8.9 Hz); 7.59 (2H, m), 7.81 (2H, m); 7.82 (1H, d, J = 15.9 Hz); 7.90 (1H, d, J = 15.6 Hz); 8.17 (1H, d, J = 1.8 Hz); 8.53 (1H, d, J = 8.3 Hz); 8.74 (1H, s); 8.82 (1H, s), 14.03 (1H, s).

^{13}C -RMN (HSQC-HMBC) (CDCl_3 , 100MHz), δ : 119.0; 124.0; 124.3; 125.0; 125.4; 126.6; 127.9; 131.0; 131.2 - 137.0; 137.2; 139.7; 148.5; 152.6; 162.9; 193.2

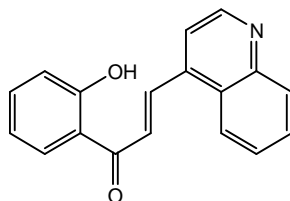
EM (m/z), (%): 355/353 (M^{+} 3), 258 (100), 229 (47), 156 (47), 127 (92), 103 (40), 77 (76).

Sólido naranja-amarillento, p.f. ($^{\circ}\text{C}$): 128.8-129.5 R (%): 10.

Procedimiento general de síntesis de chalconas de serie II SII-5 – SII9

A una solución del aldehído aromático correspondiente (1 eq.) en MeOH absoluto (12 mL/mmol), se le agrega NaOH (3 eq). La mezcla se mantiene con agitación vigorosa hasta total disolución. Se agrega luego la correspondiente aceto- o naftofenona (1eq.). La mezcla de reacción se calienta a reflujo hasta evidenciarse consumo de reactivos (3-15h). Luego de este tiempo la mezcla se neutraliza con HCl (10%, v/v) y si el producto precipita (fenoles) se filtra y lava con EP frío. El sólido se seca sobre sílicagel y su pureza se chequea cromatográficamente y por ^1H -RMN. Según se indica particularmente se purifica por CC, recristalización o se utiliza el producto así obtenido directamente. En caso de no precipitar sólido luego de la neutralización, se extrae con AcOEt (3 \times 50 mL). Las capas orgánicas se secan con Na_2SO_4 anhidro, se evapora el disolvente a presión reducida y el producto se purifica mediante CC.

SII-5: (E)-1-(2-hidroxifenil)-3-(quinolin-4-il)-2-propenona



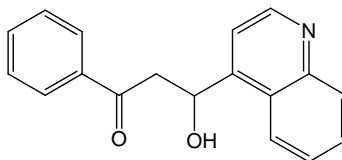
^1H -RMN (CDCl_3 , 400 MHz), δ : 7.00 (1H, dt, J_1 = 1.0 Hz, J_2 = 8.0 Hz); 7.08 (1H, dd, J_1 = 0.9 Hz, J_2 = 8.4 Hz); 7.52-7.59 (3H, m); 7.78 (1H, d, J = 15.4 Hz); 7.82 (1H, dd, J_1 = 1.4 Hz, J_2 = 8.6 Hz); 7.87-7.93 (3H, m); 8.00 (1H, dd, J_1 = 1.4 Hz, J_2 = 8.0 Hz); 8.07, (1H, s); 8.10 (1H, d, J = 15.4 Hz); 12.95 (1H, s).

^{13}C -RMN (HSQC-HMBC) (CDCl_3 , 100MHz), δ : 118.7; 118.9; 120.0; 120.1; 123.7; 126.9; 127.7; 127.9; 128.8; 128.9; 129.7; 131.2; 132.1; 133.4; 134.6; 136.5; 145.6; 163.7; 193.7.

EM (m/z), (%): 275 (M^{++} , 17), 258 (11), 156 (100), 143 (59), 128 (34), 121 (95), 92 (14).

Sólido marrón, p.f. ($^{\circ}\text{C}$): 140.0-142.5. R (%): 65.

SII-6A: 1-fenil-3-hidroxi-3-(quinolin-4-il)propanona



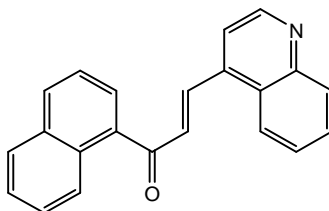
^1H -RMN (CDCl_3 , 400MHz), δ : 3.54 (1H, dd, $J_1 = 6.5$ Hz, $J_2 = 17.3$ Hz); 3.66 (1H, dd, $J_1 = 7.0$ Hz, $J_2 = 17.4$ Hz); 5.03 (1H, t, $J_1 = 6.7$ Hz, $J_2 = 13.6$ Hz); 7.35 (1H, d, $J = 4.6$ Hz); 7.61-7.44 (4H, m), 7.73 (1H, t, $J_1 = 7.0$ Hz, $J_2 = 14.1$ Hz); 7.92-8.02 (2H, m); 8.13 (1H, d, $J = 8.1$ Hz); 8.26 (1H, d, $J = 8.1$ Hz); 8.82 (1H, d, $J = 4.6$ Hz).

C: ND, problemas de solubilidad.

EM (m/z), (%): 260 ($\text{M}^{++} + 1$, 69), 242 (9), 230 (18), 154 (17), 105 (100), 77 (51).

Sólido amarillo-amarronado, p.f. ($^{\circ}\text{C}$): 137.6-143.2. R (%): 47.

SII-7: (E)-1-(naftalen-1-il)-3-(quinolin-4-il)-2-propenona



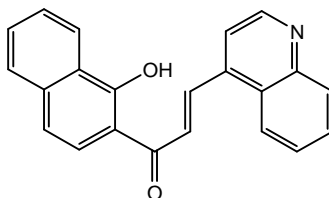
^1H -RMN (CDCl_3 , 400 MHz), δ : 7.00 (1H, dt, $J_1 = 1.0$ Hz, $J_2 = 8.0$ Hz); 7.08 (1H, dd, $J_1 = 0.9$ Hz, $J_2 = 8.4$ Hz); 7.52-7.59 (3H, m); 7.78 (1H, d, $J = 15.4$ Hz); 7.82 (1H, dd, $J_1 = 1.4$ Hz, $J_2 = 8.6$ Hz); 7.87-7.93 (3H, m); 8.00 (1H, dd, $J_1 = 1.4$ Hz, $J_2 = 8.0$ Hz); 8.07, (1H, s); 8.10 (1H, d, $J = 15.4$ Hz); 12.95 (1H, s).

^{13}C -RMN (HSQC-HMBC) (CDCl_3 , 100MHz), δ : 118.7; 118.9; 120.0; 120.1; 123.7; 126.9; 127.7; 127.9; 128.8; 128.9; 129.7; 131.2; 132.1; 133.4; 134.6; 136.5; 145.6; 163.7; 193.7.

EM (m/z), (%): 310 ($\text{M}^{++} + 1$, 39), 155 (100), 127 (100).

Sólido violeta-amarronado, p.f. ($^{\circ}\text{C}$): 105.9-108.8. R (%): 24.

SII-8: (E)-1-(1-hidroxinaftalen-2-il)-3-(quinolin-4-il)-2-propenona



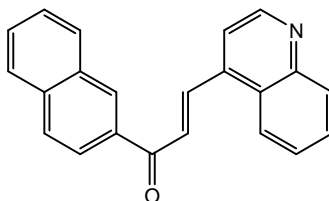
^1H -RMN (CDCl_3 , 400 MHz), δ : 7.25 (1H, d, $J = 8.9$ Hz); 7.44 (1H, t, $J_1 = 0.8$ Hz, $J_2 = 7.9$ Hz); 7.60 (5H, m); 7.86 (1H, d, $J = 15.9$ Hz); 7.90 (4H, m); 8.15 (1H, d, $J = 8.6$), 8.36 (1H, d, $J = 8.4$ Hz); 8.8 (1H, d, $J = 15.4$); 12.66 (1H, s).

^{13}C -RMN (HSQC-HMBC) (CDCl_3 , 100MHz), δ : 116.3; 119.9; 123.9; 124.4; 125.7; 125.8; 125.9; 126.8; 127.5; 128.3; 129.1; 129.3; 129.7; 129.9; 131.4; 132.0; 132.3; 132.5; 134.2; 137.3; 140.3; 163.3; 194.8.

EM (m/z), (%): 325 (M^{+} , 9), 186 (67), 171 (100), 115 (50).

Sólido marrón anaranjado, p.f. ($^{\circ}\text{C}$): 99.1- 101.3. R (%): 35.

SII-9: (E)-1-(naftalen-2-il)-3-(quinolin-4-il)-2-propenona



^1H -RMN (CDCl_3 , 400MHz), δ : 7.44 (1H, d, $J = 4.6$ Hz); 7.53-7.63 (4H, m), 7.74 (1H, m); 7.83-7.89 (2H, m); 7.93 (1H, d, $J = 7.9$ Hz); 7.94 (1H, d, $J = 8.0$ Hz); 8.02 (1H, dd, $J_1 = 1.6$ Hz, $J_2 = 8.4$ Hz); 8.16 (1H, d, $J = 7.6$ Hz); 8.33 (1H, d, $J = 8.3$ Hz), 8.50 (1H, s).

^{13}C -RMN (HSQC-HMBC) (CDCl_3 , 100MHz), δ : ND, problemas de solubilidad.

EM (m/z), (%): 310 ($\text{M}^{+} + 1$, 57), 155 (100), 127 (75).

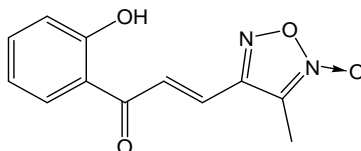
Sólido naranja, p.f. ($^{\circ}\text{C}$): 185.3-187.8. R (%): 22

SERIE III

Procedimiento General de Síntesis de Chalconas de Serie III.⁷⁵

A una suspensión de resina de trifetilfosfina (PS-TPP, 1 eq., 1.7 mmoles/g) en DMF con agitación orbital se le agrega un exceso (3 eq.) de la correspondiente bromocetona y se deja reaccionar por 12 h con agitación orbital a 65°C . Se filtra la resina y es luego lavada con DMF, CH_2Cl_2 y Et_2O (dos veces con cada disolvente) y se coloca en desecador a vacío durante 24h. A la suspensión en THF seco de resina de la sal de fosfonio así obtenida se le adiciona la base $\text{NaN}(\text{SiMe}_3)_2$ (1.2 eq.); luego de 1h en agitación orbital a temperatura ambiente se elimina el exceso de base filtrando y lavando con THF (2 veces), se vuelve a suspender la resina en THF anhidro (3mL/mmol), se le adiciona el correspondiente aldehído (0.5 eq). Se deja reaccionar por 3-30h a T amb. Se filtra la reacción, se lava la resina con AcOEt y CH_2Cl_2 y se evapora el disolvente a presión reducida. En la mayoría de los casos no se necesita posterior purificación, de ser necesario se purifican por CC.

SIII-1: (E)-1-(2-hidroxifenil)-3-(3-metilfuroxan-4-il)-2-propenona



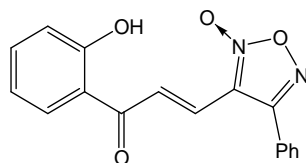
^1H -RMN (CDCl_3 , 400 MHz), δ : 2.37 (3H, s); 7.00 (1H, m); 7.08 (1H, dd, $J_1 = 0.8$ Hz, $J_2 = 8.4$ Hz); 7.59 (1H, d, $J = 15.6$ Hz); 7.60 (1H, m); 7.88 (1H, dd, $J_1 = 1.6$ Hz, $J_2 = 8.4$ Hz); 8.06 (1H, d, $J = 15.6$ Hz), 12.38 (1H, s).

^{13}C -RMN (HSQC-HMBC) (CDCl_3 , 100MHz), δ : 8.3; 111.5; 118.9, 119.4 (2C); 127.4; 127.9; 129.9; 137.6; 153.1; 163.9; 192.0.

EM (m/z), (%): 246 (M^{+} , 55), 229 (17), 216 (47), 147 (91), 121 (100), 93 (10).

Sólido amarillo, p.f. (°C): 156.6-158.8, R(%): 60.

SIII-2: (E)-3-(4-fenilfuroxan-3-il)-1-(2-hidroxifenil)-2-propenona



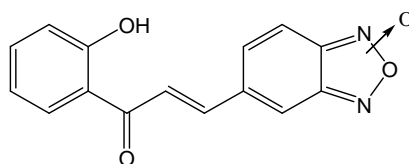
^1H -RMN (CDCl_3 , 400 MHz), δ : 7.03 (2H, m); 7.62 (1H, d, $J = 15.6$ Hz); 7.64 (6H, m); 7.91 (1H, dd, $J_1 = 1.6$ Hz, $J_2 = 8.4$ Hz); 8.59 (1H, d, $J = 15.2$ Hz); 12.46 (1H, s).

^{13}C -RMN (HSQC-HMBC) (CDCl_3 , 100MHz), δ : 118.6; 119.3; 126.3; 127.9; 128.0; 129.3; 129.3; 129.5; 129.6; 129.6; 129.7; 137.3; 154.1; 163.6; 193.1.

EM (m/z), (%): 308 (M^{+} , 13), 291 (6), 247 (21), 231 (7), 219 (35), 147 (47), 121 (43), 77 (30).

Sólido amarillo, p.f. (°C): 145.6-148.0, R(%): 99.

SIII-3: (E)-3-(benzofuroxan-5-il)-1-(2-hidroxifenil)-2-propenona



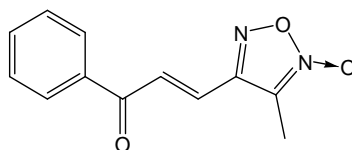
^1H -RMN (CDCl_3 , 400 MHz), δ : 7.00 (1H, m); 7.09 (1H, dd, $J_1 = 1.2$ Hz, $J_2 = 8.8$ Hz), 7.54-7.71 (4H, m); 7.73 (1H, d, $J = 15.2$ Hz); 7.78 (1H, d, $J = 15.6$ Hz); 7.92 (1H, dd, $J_1 = 1.2$ Hz, $J_2 = 8.0$ Hz), 12.58 (1H, s).

^{13}C -RMN (HSQC-HMBC) (CDCl_3 , 100MHz), δ : 109.8; 113.9; 117.1; 119.1; 120.8; 125.0; 125.1; 134.7; 136.7; 138.8; 148.7; 149.7; 166.2; 183.5.

EM (m/z), (%): 282 (M^{+} , 32), 266 (41), 221 (12), 147 (100), 121 (62).

Sólido amarillo-anaranjado, p.f.: 123.1-132.2, R(%): 82.

SIII-4: (E)-1-fenil-3-(3-metilfuroxan-4-il)-2-propenona



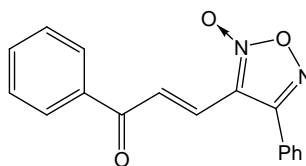
^1H -RMN (CDCl_3 , 400 MHz), δ : 2.37 (3H, s); 7.53 (1H, d, $J = 15.6$ Hz); 7.57 (2H, m); 7.68 (1H, m); 7.95 (1H, d, $J = 15.6$ Hz); 8.4 (2H, m).

^{13}C -RMN (HSQC-HMBC) (CDCl_3 , 100MHz), δ : 8.3; 111.6; 126.9; 128.8; 129.0; 129.2; 134.0; 136.7; 153.3; 188.5.

EM (m/z), (%): 230 (M^{+} , 11), 214 (2), 170 (25), 105 (100), 77 (62).

Sólido amarillo-anaranjado, p.f. (°C): 114.2-116.4, R(%): 86.

SIII-5: (E)-1-fenil-3-(4-fenilfuroxan-3-il)-2-propenona



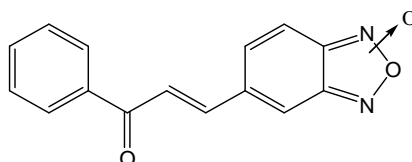
^1H -RMN (CDCl_3 , 400 MHz), δ : 7.56 (1H, d, $J = 15.2$ Hz); 7.54-7.73 (9H, m); 8.08 (1H, dd, $J_1 = 1.2$ Hz, $J_2 = 8.0$ Hz); 8.51 (1H, d, $J = 15.6$ Hz).

^{13}C -RMN (HSQC-HMBC) (CDCl_3 , 100MHz), δ : 112.5; 122.7; 125.6; 127.4; 128.3; 128.8; 128.9; 129.6; 131.5; 133.8; 137.0; 156.7; 188.9.

EM (m/z), (%): 292 (M^+ , 16), 262 (3), 231 (70), 215 (10), 203 (56), 127 (25), 105 (100), 77 (72).

Sólido amarillo pálido, p.f. ($^{\circ}\text{C}$): 138.2-140.1, R(%): 100.

SIII-6: (*E*)-3-(benzofuroxan-5-il)-1-fenil-2-propenona

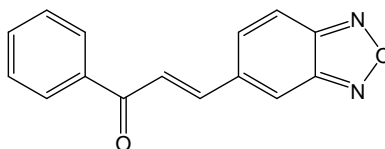


^1H -RMN (CDCl_3 , 400 MHz), δ : 7.54-7.70 (4H, m); 7.58 (1H, d, $J = 15.3$ Hz); 7.59 (2H, d, $J = 10.8$ Hz); 7.79 (1H, d, $J = 15.6$ Hz); 8.06 (2H, d, $J = 7.7$ Hz).

EM (m/z), (%): 266 (M^+ , 85), 250 (58), 208 (35), 206 (41), 178 (34), 152 (25), 105 (80), 77 (100).

Sólido amarillo, p.f. ($^{\circ}\text{C}$): 170.0-171.2, R (%): 53.

SIII-6R: (*E*)-3-(benzofurazan-5-il)-1-fenil-2-propenona

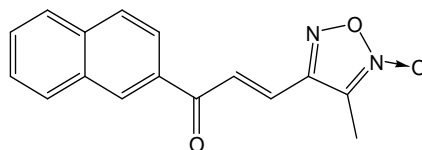


^1H -RMN (CDCl_3 , 400 MHz), δ : 7.57 (2H, t, $J_1 = 7.7$ Hz, $J_2 = 15.0$ Hz) 7.66 (1H, m); 7.69 (1H, d, $J = 15.8$ Hz); 7.79 (1H, dd, $J_1 = 1.1$ Hz, $J_2 = 9.4$ Hz); 7.89 (1H, d, $J = 15.7$ Hz); 7.95 (1H, d, $J = 9.4$); 8.05 (1H, s); 8.07 (2H, d, $J = 7.2$ Hz).

EM (m/z), (%): 250 (M^+ , 100), 233 (18), 165 (25), 105 (54), 77 (75).

Sólido amarillo, p.f. ($^{\circ}\text{C}$): 180.5-182.0, R(%): 90.

SIII-7: (*E*)-3-(3-metilfuroxan-4-il)-1-(2-naftil)-2-propenona



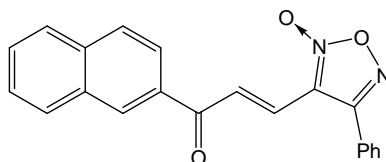
^1H -RMN (CDCl_3 , 400 MHz), δ : 2.39 (3H, s); 7.57 (1H, d, $J = 15.6$); 7.63 (1H, dt, $J_1 = 1.2$ Hz, $J_2 = 8.0$ Hz); 7.68 (1H, dt, $J_1 = 1.2$ Hz, $J_2 = 8.0$ Hz); 7.94 (1H, d, $J = 8.4$); 7.99 (1H, d, $J = 8.8$); 8.04 (1H, d, $J = 8.0$); 8.13 (1H, dd, $J_1 = 1.6$ Hz, $J_2 = 8.8$ Hz); 8.14 (1H, d, $J = 15.6$); 8.58 (1H, s).

^{13}C -RMN (HSQC-HMBC) (CDCl_3 , 100MHz), δ : 8.3; 111.6; 124.1; 126.7; 127.2; 127.9; 129.1; 129.7; 129.2; 129.8; 130.9; 132.5; 134.1; 136.0; 153.4; 188.2.

EM (m/z), (%): 280 (M^+ , 87), 250 (2), 220 (65), 155 (95), 127 (100).

Sólido amarillo-anaranjado, p.f. ($^{\circ}\text{C}$): 158.0-159.8, R(%): 52.

SIII-8: (*E*)-3-(4-fenilfuroxan-3-il)-1-(2-naftil)-2-propenona



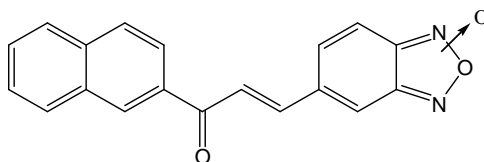
^1H -RMN (CDCl_3 , 400 MHz), δ : 7.63 (1H, d, J = 15.6 Hz); 7.65 (5H, m); 7.74 (2H, m); 7.93 (1H, d, J = 8.0 Hz); 7.99 (1H, d, J = 8.8 Hz); 8.06 (1H, d, 8.1 Hz); 8.13 (1H, dd, J_1 = 1.6 Hz, J_2 = 8.8 Hz); 8.60 (1H, s); 8.70 (1H, d, J = 15.2 Hz).

^{13}C -RMN (HSQC-HMBC) (CDCl_3 , 100MHz), δ : 112.7; 122.6; 124.1; 125.6; 127.1; 127.5; 127.9; 128.4; 129.90; 129.1; 129.6; 129.9; 130.9; 131.6; 132.5; 134.3; 135.9; 156.8; 188.9.

EM (m/z), (%): 330 ($\text{M}^{+\bullet}$, 5), 269 (18), 155 (32), 127 (100).

Sólido amarillo pálido, p.f. ($^{\circ}\text{C}$): 185.3-186.7, R(%): 95.

SIII-9: (E)-3-(benzofuroxan-5-il)-1-(2-naftil)-2-propenona



^1H -RMN (CDCl_3 , 400 MHz), δ : 7.61-7.76 (5H, m); 7.79 (1H, d, J = 16.0 Hz); 7.85 (1H, d, J = 15.6 Hz); 7.95 (1H, d, J = 8.0 Hz); 8.00 (1H, d, 8.4 Hz); 8.05 (1H, dd, J_1 = 0.4 Hz, J_2 = 8.0 Hz); 8.13 (1H, dd, J_1 = 2.0 Hz, J_2 = 8.8 Hz); 8.56 (1H, s).

^{13}C -RMN (HSQC-HMBC) (CDCl_3 , 100MHz), δ : 124.2; 127.1; 127.9; 128.9; 128.9; 129.6; 130.3; 132.5; 134.8; 135.7; 141.0; 189.1.

EM (m/z), (%): 316 ($\text{M}^{+\bullet}$, 3), 300 (71), 256 (12), 155 (48), 127 (100).

Sólido amarillo-mostaza, p.f. ($^{\circ}\text{C}$): 202.5-203.6, R(%): 16.

EVALUACIÓN BIOLÓGICA

SCREENING DE ACTIVIDAD MONOFUNCIONAL DE ENZIMAS DE FASE II

Los resultados obtenidos en la evaluación de todos los compuestos ensayados se presentan en figura 3.12 y tabla 3.9, y permiten clasificarlos en tres grandes grupos: 1) inactivos en la inducción de QR en ambas líneas celulares (de ahora en más inactivos); 2) activos en ambas líneas en la inducción de QR (inductores con carácter monofuncional); 3) activos en una línea celular, a) activos solamente en Hepa1c1c7 (inductores con carácter bifuncional) y b) activos solamente en BprC1 (inductores excepcionales). Esta clasificación se puede apreciar más claramente en la tabla 3.8.

Tabla 3.8. Clasificación de inductores de enzimas detoxificantes de fase II según ensayo de *screening* de inducción de QR.

Clasificación		Activos en Hepa1c1c7	Activos en BprC1	Observaciones
I				Inactivos
II		✓	✓	Inductores monofuncionales ^a
III	A	✓		Inductores bifuncionales
	B		✓	Inductores excepcionales

^a aquellos inductores con carácter bifuncional o excepcional pero que provocan un incremento \geq al 40% en ambas líneas celulares respecto al control negativo serán considerados inductores monofuncionales siempre y cuando la actividad en una línea no quintuple la de la otra.

Aquellos compuestos que pertenecen a las clase III B se les llamó inductores excepcionales porque *a priori* no está claro el mecanismo a nivel molecular mediante el cual producen este efecto. Como se explicó anteriormente, y se esquematiza en figura 3.11, la única diferencia entre las dos líneas celulares utilizadas en el modelo es que la línea mutante de Hepa1c1c7 (*wf*), BprC1 es defectiva en la proteína Arnt y por tanto es incapaz de translocar el complejo Ahr-inductor al núcleo. Por tanto considerando que la vía Ahr-XRE es la responsable mayoritaria de la inducción conjunta de enzimas de fase I y II y que la vía Nrf2-ARE la principal en la inducción de enzimas de fase II como la QR testada se esperaba que un compuesto que sea totalmente inactivo en la línea Hepa1c1c7 también lo fuera en la línea mutante BprC1. El modelo utilizado en este trabajo sería por tanto incapaz de explicar este comportamiento. Una hipótesis plausible es que estén interviniendo para esta clase de inductores otras vías de inducción coreguladas por la vía Ahr-XRE. Por otro lado, la mayoría de los agentes inductores son metabolizados por las enzimas que resultan sobreexpresadas por su presencia. Al existir una vía trunca en la línea BprC1, la cinética de estos compuestos dentro de las células puede cambiar, así por ejemplo, un compuesto que activa la vía Ahr-XRE y es metabolizado por enzimas de fase I, puede acumularse y producir un efecto que no sea detectable a bajas concentraciones intracelulares. Puede por ejemplo dimerizarse y actuar como inductor monofuncional a través de la vía ARE-Nrf2 y de esta manera se observaría un efecto típico del clasificado como III B. Estos compuestos por ende merecen mayor estudio pero escapan a los objetivos primarios de esta tesis en la que se busca identificar inductores que en condiciones normales, es decir con todas

las vías de inducción funcionando correctamente, no se sobreexpresen ciertas isoformas de CYP concomitantemente con la inducción de enzimas detoxificantes de fase II.

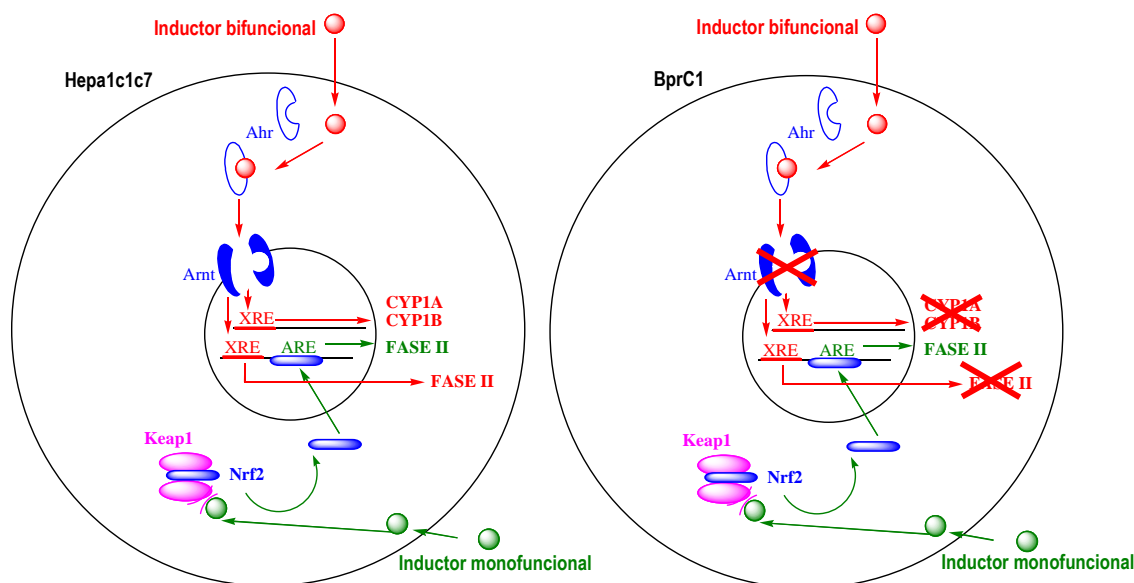


Figura 3.11. Inducción de enzimas de fase I y II por inductores monofuncionales y bifuncionales. Los inductores monofuncionales (en verde) entran a la célula interaccionan con Keap1, que actúa como “sensor” transmitiendo las señales inductoras (Nrf2) para activar la transcripción de los genes de fase II a través de la secuencia ARE. Los inductores bifuncionales (en rojo) pueden actuar por dos mecanismos diferentes: a) Unirse directamente al receptor de hidrocarburos aromáticos (Ahr) en el citoplasma, con la subsecuente translocación del complejo al núcleo y unión al elemento XRE de los genes de fase I para activar su transcripción. b) Además de las secuencia ARE, algunos genes de fase II también contienen la secuencia XRE funcional y por tanto pueden ser activados por este complejo. Se esquematizan las vías funcionales para las líneas Hepa1c1c7 (izquierda) y BprC1 (derecha).

Uno de los compuestos que produce el efecto más marcado dentro de este grupo es el **SI-3D** el cual es además un subproducto aislado en la síntesis de **SI-3**. Cabe destacar que este subproducto fue el único de su clase que se aisló en cantidades suficientes para ser ensayado. Por ende, no se puede comparar con actividades de estructuras similares, la adición nucleofílica de Michael 1,4 de una segunda molécula de acetofenona al compuesto **SI-3** para la obtención de **SI-3D** produce un compuesto con mayor volumen, mayor lipofilicidad, pérdida del sistema conjugado de electrones entre el fenilo y el naftilo, pérdida de la planaridad, entre otros cambios. Considerando estas particularidades estructurales del compuesto **SI-3D** con respecto a las chalconas no es de extrañar una actividad marcada perteneciente a la clase IIIB. Dentro de esta clasificación también se encuentran con actividad decreciente los compuestos **SIII-6>SIII-6R>SII-6A>SI-4>SI-8**. En el caso de los compuestos **SIII-6** y **SIII-6R** parece claro que la actividad es dependiente de la presencia del heterociclo benzooxadiazol e independiente de la función *N*-óxido dado de que se trata de un Bfx y el correspondiente Bfz. Los restantes Bfx de la serie, **SIII-3** y **SIII-9**, son inductores bifuncionales pero esta clasificación parece estar influenciada por el anillo A de estos como se comenta más adelante. El derivado **SII-6A** es el producto de condensación aldólica aislado durante la síntesis de **SII-6**, carece del sistema de Michael 1,4 por lo que tampoco

posee homogeneidad estructural con las demás chalconas. El caso de los compuestos **SI-4** y **SI-8** es bien interesante porque se trata de isómeros de posición que se pueden ver como retro-bioisómeros⁸⁴ en los cuales los anillos A y B se encuentran intercambiados. En cuanto a las características estructurales que provocan esta actividad puede estar influenciada por la ausencia de funcionalidades extras al sistema diarilpropenona ya que aquellos compuestos que las carecen resultan o bien inactivos o bien inductores excepcionales del grupo IIIB.

Solamente dos de los treinta y dos compuestos evaluados resultan ser inactivos en ambas líneas celulares, los clasificados como I según tabla 3.8. Estos son **SI-3** y **SI-7**, los cuales también carecen de funcionalidades extras al sistema diarilpropenona y son retro-bioisómeros al igual que **SI-4** y **SI-8**.

La mayoría de los derivados estudiados muestran ser inductores bifuncionales en diversa medida, a continuación se ordenan en forma decreciente las 16 chalconas de este grupo: **SII-5>SI-8A>SI-6>SI-5A>SIII-8>SII-4>SI-10>SIII-9>SII-8>SII-3>SI-11>SI-9>SIII-7>SIII-3>SIII-4>SIII-1**. Dentro de este grupo, se destacan con altas tasas de inducción bifuncional dos de los tres aldoles evaluados, los derivados **SI-8A** y **SI-5A**, cabe recordar que el tercer aldol ensayado (**SII-6A**) resultó clasificado como inductor excepcional. De lo anterior se desprende que en principio la pérdida del sistema conjugado y/o la presencia de OH aldólico no son de interés para lograr la actividad deseada. Todos los derivados de 2-hidroxi-1-acetonaftil y 1-hidroxi-2-acetonaftil chalconas resultaron ser claros inductores bifuncionales, estos son **SI-5A**, **SI-6**, **SI-9**, **SI-10**, **SI-11**, **SII-4**, **SII-8**. La presencia de este agrupamiento estructural a modo de anillo A favorece notoriamente la actividad bifuncional. Considerando los inductores bifuncionales de la serie I, la totalidad cumple con alguno de estos dos requerimientos estructurales descritos o con ambos como es el caso de **SI-5A**. Con la serie II ocurre lo mismo con la excepción de los derivados **SII-5** y **SII-3**, que no son aldoles ni tampoco hidroxinaftil chalconas. Este último compuesto posee a modo de anillo B una piridina bromo sustituida (5-bromo-3-piridinil) al igual el derivado **SII-4** el cual como ya se comentó es además una hidroxinaftil chalcona y también resulta inductor bifuncional. Es posible entonces que el anillo B, 5-bromo-3-piridinil también esté contribuyendo a la inducción de carácter bifuncional de estos dos compuestos (**SII-3** y **SII-4**). Existen descripciones previas de flavonoides conteniendo fenilos bromo sustituidos como anillo B que resultan inductores bifuncionales como es el caso del control positivo para esta actividad, **FV4Br**, y también se ha observado que la sustitución *o*, *m*, *p* con diferentes halógenos modifica significativamente los niveles de inducción.⁸⁵ El derivado **SII-5** por su parte resulta más difícil de explicar su comportamiento ya que como se menciona más adelante en la discusión de inductores monofuncionales, este compuesto presenta agrupamientos estructurales que en general contribuyen con ese tipo de actividad. En la serie III se encuentran los inductores bifuncionales más diversos estructuralmente, la relación estructura actividad más clara es que las tres chalconas que contenían 2-naftaleno como anillo A resultan inductores bifuncionales independientemente de si el anillo B es MeFx, PhFx o BFX. Las demás metilfuroxanil y

⁸⁴ Barreiro, E.J.; Manssour-Fraga, C.A. *Química medicinal: as bases moleculares da ação dos fármacos*. Artmed, 2008, 2ª Ed., San Pablo, Brasil.

⁸⁵ Song, L. L.; Kosmeder II, J. W.; Kook Lee, S.; Gerhäuser, C.; Lantvit, D.; Moon, R. C.; Moriarty, R. M.; Pezzuto, J. M. Cancer chemopreventive activity mediated by 4'-bromoflavone, a potent inducer of phase II detoxification enzymes. *Cancer Res.* 1999, 59: 573-585.

benzofuroxanil chalconas de la serie también resultaron inductores bifuncionales o inductores excepcionales como ya se discutió. El sistema PhFx parece ser el único agrupamiento prometedor de esta serie para lograr la actividad de interés.

Finalmente fue posible identificar ocho inductores monofuncionales repartidos en las tres series sintetizadas. Estos son **SI-1** y **SI-2** (serie I); **SII-1**, **SII-2**, **SII-7** y **SII-9** (serie II); y **SIII-2** y **SIII-5** (serie III). La mayoría de ellos (5 de 8) contienen a modo de anillo A *o*-hidroxifenilo, este requerimiento estructural ya había sido observado en antecedentes previos de nuestro grupo (capítulo antecedentes y justificación) y se corrobora aquí nuevamente para los compuestos **SI-1**, **SI-2**, **SII-1**, **SII-2**, y **SIII-2**. Cuando se elimina la *o*-hidroxi sustitución del derivado **SIII-2** para dar **SIII-5**, se pierde actividad pero igualmente se logran muy buenos niveles de inducción lo que corrobora lo anteriormente mencionado de que un fenilfuroxano como anillo B contribuye significativamente con la actividad deseada. Cabe destacar que los 8 inductores contienen en su estructura un centro electrofílico de Michael, lo que afirma la hipótesis de su esencialidad para ser atacado por los tioles reactivos de Keap1 y así desencadenar la translocación de nrf2 al núcleo.⁸⁶ Los restantes inductores de este grupo de interés son dos naftil-quinolin chalconas (**SII-7** y **SII-9**). Datos interesantes surgen cuando se compara el efecto de la sustitución del anillo A de 1-naftil (**SII-7**) a 2-naftil (**SII-9**) lo provoca una caída en la inducción de QR de casi 25 %. Algo similar ocurre cuando se realiza el mismo cambio pero a nivel del anillo B en los derivados **SI-1** y **SI-2**. Parece claro además que la sustitución de 1-naftil en vez de 2-naftil en cualquiera de los anillos A o B provoca aumento de la inducción QR en una o las dos líneas celulares (otras clasificaciones), compárese las actividades de los derivados **SI-3** y **SI-4**; **SI-7** y **SI-8**; **SI-9** y **SI-10**. Volviendo a los inductores monofuncionales es interesante hipotetizar acerca del mecanismo de inducción de los derivados de la serie III. Como ya se mencionara los compuestos más interesantes de esta serie fueron los que contenían PhFx a modo de anillo B, **SIII-2** y **SIII-5**. Como también se mencionara ha sido extensamente descrito que los centros aceptores de Michael son farmacofóricos de Keap1-Nrf2 por ser susceptibles a ataque nucleofílico 1-4 por tioles clave de Keap1, en particular la Cys 151 se ha observado que participa en la alquilación a este nivel de flavonoides naturales.^{87,88} En este sentido nótese que en los derivados de fenilfuroxanos ensayados el agrupamiento *N*-óxido al encontrarse espacialmente más cercano al carbono 4 del centro de Michael (comparado con metilfuroxano) ejerce un efecto electrón atrayente –I sobre éste haciéndolo por tanto más electrofílico y por ende aumentando la posibilidad de interaccionar con Keap1. De los tres fenilfuroxanos evaluados dos mostraron ser fuertes inductores monofuncionales de clase II, los que poseen como anillo A un grupo fenilo o 2-hidroxifenilo. El único

⁸⁶ Cabrera, M. Evaluación de la modulación de enzimas detoxificantes de xenobióticos por análogos sintéticos de flavonoides naturales: potenciales agentes quimiopreventivos para el cáncer. *Trabajo especial II*, Licenciatura en Bioquímica, Facultad de Ciencias, UdelaR., Montevideo, Uruguay. 2006

⁸⁷ Luo, Y.; Eggler, A. L.; Liu, D.; Liu, G.; Mesecar, A.D.; van Breemen, R.B. Sites of alkylation of human keap1 by natural chemoprevention agents. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 2007, 18, 2226–2232.

⁸⁸ Dinkova-Kostova, A. T.; Massiah, M.A.; Bozak, R.E.; Hicks, R.J.; Talalay, P. Potency of Michael reaction acceptors as inducers of enzymes that protect against carcinogenesis depends on their reactivity with sulfhydryl groups. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2001, 98(6): 3404–3409.

fenilfuroxano que presenta actividad pero típicamente de carácter monofuncional es el **SIII-8** pero como ya se discutió anteriormente esta clase de actividad parece ser determinada en esta familia de compuestos (**SIII-7** – **SIII-9**) por el agrupamiento naftilo a modo de anillo A de la chalcona. Las chalconas de metilfuroxanos también mostraron actividad monofuncional del tipo II y bifuncional de tipo IIIA pero de menor magnitud que los correspondientes análogos de fenilfuroxano. Esto se puede explicar en parte porque el efecto –I sobre el carbono 4 del sistema de Michael del N-óxido al encontrarse localizado en el N5 del oxadiazol y no en el N2 como en el caso de los fenilfuroxanos es mucho menor. Por otro lado más recientemente ha sido descrito que liberadores de NO pueden actuar como inductores monofuncionales de fase II a través de la S-nitrosilación de Cys273 y/o Cys288 de Keap1 y subsecuente translocación al núcleo de Nrf-2.^{89,90} En el caso particular de los furoxanos es posible que estos residuos se S-nitrosilen tras el ataque nucleofílico del –SH (273 y/o 288) al nitrosoderivado **NO-III** (ver figura 3.13), reacción que rinde además anión nitroxilo que tras oxidación para dar NO puede S-nitrosilar otros residuos de Cys273 y/o Cys288. Otro mecanismo propuesto de inducción de enzimas de fase II para liberadores de NO es la S-guanilación de Keap1 a partir de 8-nitro-GMPc previa nitración con NO de GMPc como se esquematiza en figura 3.12.^{91,92} Estudios de nuestro grupo han demostrado la capacidad liberadora de NO de varios derivados de N-óxidos de oxadiazol y se ha observado una tendencia a la liberación en el siguiente orden: PhFx>MeFx>BFx, también se ha evidenciado que la liberación se exagera en presencia de tioles.^{93,94,95} En la figura 3.13 se esquematiza uno de los mecanismos descritos de liberación de NO por furoxanos en presencia de tioles.⁹⁸ Por último otro mecanismo propuesto de activación de la vía Nrf2-ARE que podrían activar los derivados de la Serie III es la fosforilación de la Ser40 de Nrf-2 por la fosfoquinasa C (PKC). Existen descripciones de que PKC se puede activar por S-nitrosilación en presencia de NO y una vez activa fosforilar a Nrf2 con subsecuente liberación de Keap 1 y translocación al núcleo.^{96,97}

⁸⁹ Um, H.C.; Jang, J.H.; Kim, D.H.; Lee, C.; Surh, Y.J. Nitric oxide activates Nrf2 through S-nitrosylation of Keap1 in PC12 cells. *Nitric Oxide*, 2011, 25(2):161-168.

⁹⁰ Buckley, B.J.; Li, S.; Whorton, A.R. Keap1 modification and nuclear accumulation in response to S-nitrosylation. *Free Radic Biol Med.*, 2008, 44(4): 692–698.

⁹¹ Akaike, T.; Fujii, S.; Sawa, T.; Ihara, M. Cell signaling mediated by nitrated cyclic guanine nucleotide. *Nitric Oxide*, 2010, 23: 166–17.

⁹² Fujii, S.; Sawa, T.; Ihara, H.; Tong, K.I.; Ida, T.; Okamoto, T.; Ahtesham, A.K.; Ishima, Y.; Motohashi, H.; Yamamoto, M.; Akaike, T. The critical role of nitric oxide signaling, via protein S-guanylation and nitrated cyclic GMP in the antioxidant adaptive response. *J. Biol. Chem.*, 2010, 285(31): 23970-23984.

⁹³ Aguirre, G.; Boiani, L.; Cerecetto, H.; Di Maio, R.; González, M.; Porcal, W.; Denicola, A.; Möller, M.; Thomson, L.; Tortora, V. Benzo[1,2-c]1,2,5-oxadiazole N-oxide derivatives as potential antitrypanosomal drugs. Part 3: Substituents-clustering methodology in the search for new active compounds. *Bioorg. Med. Chem.*, 2005, 13: 6324-6335.

⁹⁴ Möller, M. Determinación de capacidad antioxidante: uso de modelos químicos y biológicos. *Trabajo Especial II*, Lic. en Bioquímica, Facultad de Ciencias, UdelAR, Montevideo, Uruguay, 2001.

⁹⁵ Hernández, P.; Cabrera, M.; Lavaggi M.L.; Celano, L.; Tiscornia I.; Rodrigues da Costa, T.; Thomson, L.; Bollati-Fogolín, M.; Miranda, A.L.; Lima, L.M.; Barreiro, E.J.; González, M.; Cerecetto, H. Discovery of new orally effective analgesic and anti-inflammatory hybrid furoxanyl N-acylhydrazone derivatives. *Bioorg. Med. Chem.*, 2012, 20: 2158–2171.

⁹⁶ Huang, H.C.; Nguyen, N.; Pickett, C.B. Phosphorylation of Nrf2 at Ser-40 by protein kinase C regulates antioxidant response element-mediated transcription. *J. Biol. Chem.*, 2002, 277 (45): 42769-42774.

Tabla 3.9. Inducción de QR por los compuestos SI-1 – SIII-9.

Ref.	Tasa inducción QR (células tratadas/ células control negativo \pm DE) ^a	
	Hepa1c1c7	BprC1
SI-1	3,21 \pm 0,16*	2,21 \pm 0,29*
SI-2	2,96 \pm 0,49*	1,39 \pm 0,07*
SI-3	0,88 \pm 0,23	0,92 \pm 0,24
SI-3D	0,83 \pm 0,01	2,38 \pm 0,37*
SI-4	0,95 \pm 0,10	1,41 \pm 0,12*
SI-5A	3,31 \pm 0,60*	1,14 \pm 0,09
SI-6	3,04 \pm 0,32*	0,57 \pm 0,05*
SI-7	0,98 \pm 0,09	1,13 \pm 0,13
SI-8	0,96 \pm 0,08	1,21 \pm 0,21
SI-8A	5,04 \pm 0,09*	1,74 \pm 0,02*
SI-9	1,29 \pm 0,49	0,82 \pm 0,23
SI-10	1,76 \pm 0,23*	0,79 \pm 0,12
SI-11	1,44 \pm 0,10*	0,97 \pm 0,34
SII-1	1,57 \pm 0,39	1,98 \pm 0,47*
SII-2	1,23 \pm 0,23	1,18 \pm 0,12
SII-3	1,51 \pm 0,23*	1,03 \pm 0,0
SII-4	2,30 \pm 0,31*	1,13 \pm 0,04
SII-5	5,42 \pm 0,30*	1,34 \pm 0,15*
SII-6A	1,04 \pm 0,26	1,35 \pm 0,45
SII-7	1,43 \pm 0,03*	1,83 \pm 0,0*
SII-8	1,48 \pm 0,30	0,85 \pm 0,31
SII-9	1,28 \pm 0,41	1,25 \pm 0,32
SIII-1	1,49 \pm 0,09*	1,18 \pm 0,08
SIII-2	3,01 \pm 0,27*	1,82 \pm 0,15*
SIII-3	1,39 \pm 0,24	1,18 \pm 0,20
SIII-4	1,35 \pm 0,22*	1,01 \pm 0,16
SIII-5	1,90 \pm 0,41*	1,58 \pm 0,01*
SIII-6	1,01 \pm 0,08	1,70 \pm 0,07*
SIII-6R	0,99 \pm 0,09	1,51 \pm 0,06*
SIII-7	1,49 \pm 0,21	0,99 \pm 0,16
SIII-8	2,49 \pm 0,47*	1,06 \pm 0,05
SIII-9	1,77 \pm 0,21*	1,01 \pm 0,06
C (-) ^b	1,00 \pm 0,09	1,00 \pm 0,08

Tabla 3.9. continuación

t-BHQ^c	1,79 ± 0,31*	2,30 ± 0,20*
FV4Br^d	4,45 ± 0,35*	1,49 ± 0,56*

^a dosis 10 µM. ^b C (-): control negativo, ^c tBHQ, control positivo monofuncional, ^d FV4Br, control positivo bifuncional.

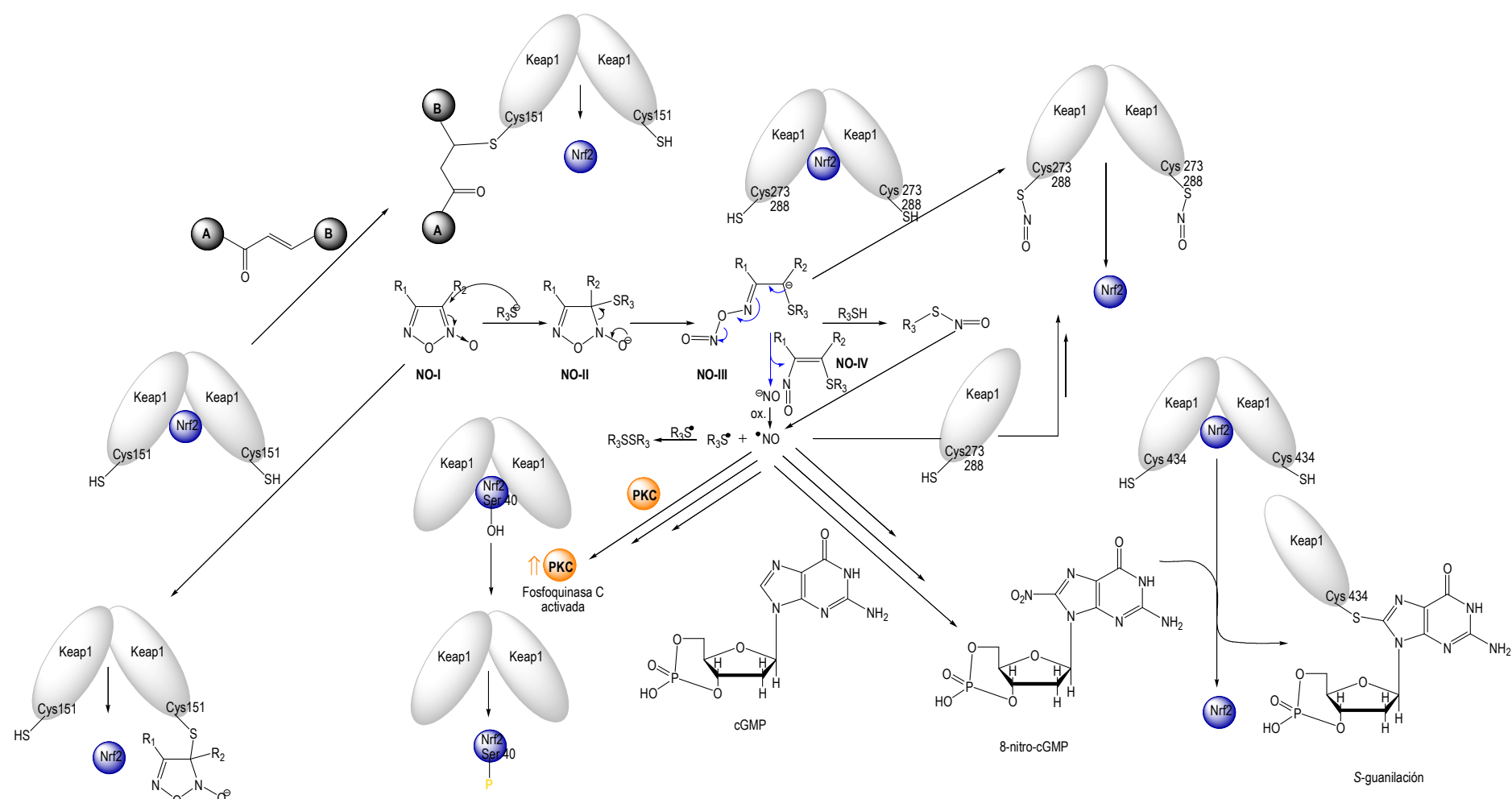


Figura 3.13. Mecanismos propuestos de activación de la vía Nrf-2-ARE por las chalconas evaluadas. Se esquematiza también el mecanismo de liberación de NO dependiente de tioles por furoxanos.⁹⁸

⁹⁸ Gasco, A.; Fruttero, R.; Sorba, G.; Di Stilo, A.; Calvino, R. NO donors: focus on furoxan derivatives. *Pure Appl. Chem.*, 2004, 76 (5): 973-981.

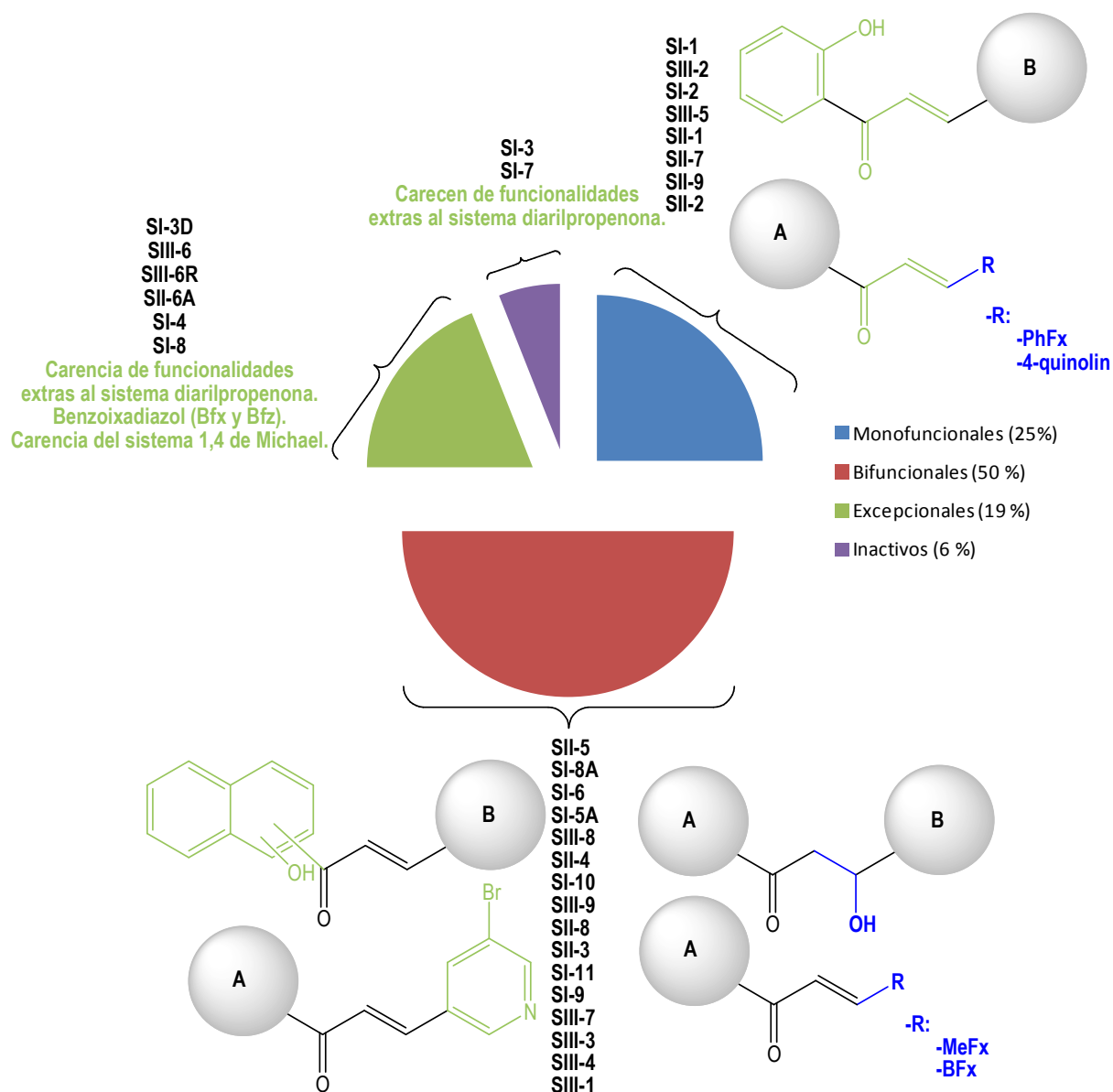


Figura 3.14. Se grafica la distribución de los 32 compuestos ensayados en el *screening* de actividad inductora de QR según pertenezcan a inductores: monofuncionales, bifuncionales, excepcionales o inactivos. Se enumeran los compuestos dentro de cada clasificación en orden de relevancia y en verde se destacan los agrupamientos farmacofóricos identificados como responsables de dicha actividad y en azul los que parecen contribuir a la misma.

DETERMINACIÓN DE ÍNDICE DE QUIMIOPREVENCIÓN

En base a los resultados obtenidos en el *screening* primario de actividad QR se seleccionaron los compuestos **SI-1**, **SI-2**, **SII-1**, **SIII-2** y **SIII-5** para ser estudiados más en profundidad en cuanto a la determinación de parámetros de eficiencia y selectividad, como CD (concentración necesaria para duplicar la actividad QR), IC₅₀, IC (índice quimiopreventivo (IC₅₀/CD)), y mecanismo de acción.

Así, en la tabla 3.10 se presentan los resultados de CD, IC₅₀ e IC determinados en las líneas Hepa1c1c7 y BprC1, lo deseable son moléculas que dupliquen la actividad de enzimas de fase II a bajas concentraciones, es decir bajos valores de CD y a su vez resulten poco citotóxicos, altos valores de IC₅₀.

El compuesto más relevante es el **SII-1** dado que posee valores de CD del orden de 10 μM en ambas líneas celulares, afirmando su carácter de inductor monofuncional. Además resulta poco citotóxico también en ambas líneas con valores de IC₅₀ de 40-200 μM . Los valores de CD para **SII-1** comparados con los de otros compuestos bien descritos como inductores monofuncionales, *t*-BHQ (CD_{BprC1}: 6 μM), Isoliquiritigenina (CD_{BprC1}: 10 μM) y sulforafano (CD_{BprC1}: 0,5 μM),⁹⁹ resultan del mismo orden o levemente superiores. Sin embargo, todos estos últimos compuestos son más citotóxicos en BprC1 que **SII-1**. Así, **SII-1** presenta el mayor índice de quimiopreención (IC: > 20 μM) en la línea BprC1 de todos los compuestos ensayados y de los previamente descritos que se presentan en la tabla 3.10. Es interesante analizar los dos flavonoides presentados en la tabla 3.10 previamente bien descritos como agentes quimiopreventivos para el cáncer a través de la modulación de enzimas de metabolización. La flavona **FV4Br** se corrobora su carácter de inductor bifuncional y los parámetros de CD, IC₅₀ e IC de la isoliquiritigenina son comparables con los obtenidos para todas las chalconas evaluadas en este trabajo.

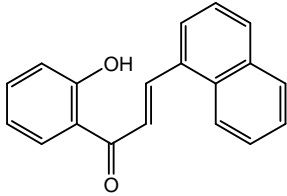
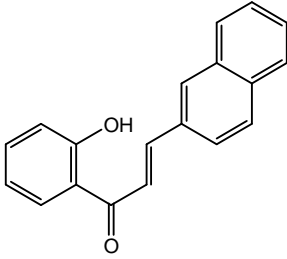
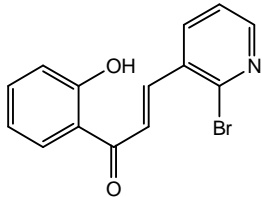
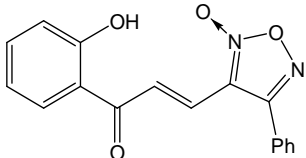
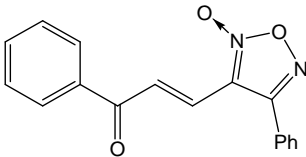
El menor valor de CD obtenido resultó ser CD_{Hepa1c1c7}: 0,5 μM para **SI-2** pero sin embargo es la chalcona con mayor carácter bifuncional de las seleccionadas para estos estudios (CD_{BprC1}: 20 μM). Esta actividad puede estar dada en parte por el agrupamiento naftilo dado que otros flavonoides descritos con este agrupamiento como la β -naftoflavona son inductores de este tipo.¹⁰⁰ Algo de carácter bifuncional, pero en menor medida, puede observarse también cuando se analizan los valores de CD del compuesto **SI-1** (CD_{Hepa1c1c7}: 3 μM , CD_{BprC1}: 10 μM) el cual también posee un agrupamiento naftilo como anillo A.

Los derivados de fenilfuroxanilchalconas **SIII-2** y **SIII-5** muestran un comportamiento muy similar entre si, presentando valores de CD que van desde 8-13 μM y IC de 3-5. Estos valores son mejores comparados con **FV4Br** y comparables con los de la chalcona natural isoliquiritigenina.

⁹⁹ Cuendet, M.; Oteham, C.P.; Moon, R.C.; Pezzutto, J.M. Quinone reductase induction as biomarker for cancer chemoprevention. *J. Nat. Prod.*, 2006, 69(3): 460-463.

¹⁰⁰ Lee, C.; Chew, E.; Go, M. Functionalized aurones as inducers of NAD(P)H:quinine oxidoreductase 1 that activate Ahr/XRE and Nrf2/ARE signaling pathways: Synthesis, evaluation and SAR. *EJMC*, 2010, 45:2975-2971.

Tabla 3.10. Se presentan los valores de CD, IC₅₀ e IC determinados en las líneas Hepa1c1c7 y BprC1 para los compuestos SI-1, SI-2, SII-1 y SIII-2, SIII-5.

Compuesto	Hepa1c1c7			BprC1		
	CD	IC ₅₀	IC	CD	IC ₅₀	IC
 SI-1	3	33	3	10	45	5
 SI-2	0,5	85	170	20	85	4
 SII-1	14	39	3	10	>200	>20
 SIII-2	8	40	5	12	38	3
 SIII-5	12	36	3	13	38	3
FV4Br	0,8	85	108	>75	150	<2
t-BHQ	1	147	147	6	60	10
Isoliquiritigenina^a	2	20	10	10	17	2
sulforafano^a	0,3	6	20	0,5	8	16


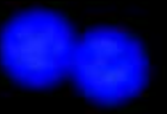



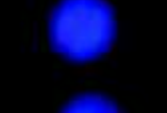

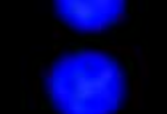
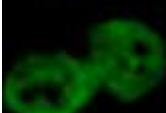
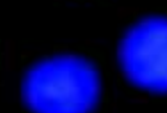
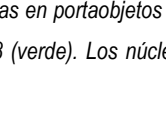
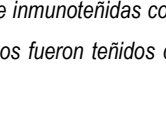
CD: concentración (μM) necesaria para duplicar la Act. QR. IC₅₀: concentración (μM) que causa el 50 % de muerte celular. IC: índice quimiopreventivo (IC₅₀/CD).^a Cuendet, M. et al. J. Nat. Prod., 2006, 69(3): 460-463.

ESTUDIO DE TRANSLOCACION DE Nrf2 AL NÚCLEO

Recordando el modelo celular utilizado en el *screening* primario, se sabe que éste permite discriminar entre inductores mono y bifuncionales pero estrictamente hablando no permite afirmar, si bien en la discusión se daba por hecho, que la inducción sea vía Nrf-2-ARE. En realidad lo que se puede aseverar con la utilización del modelo es que, si la inducción de QR resulta similar en ambas líneas celulares ensayadas, no es consecuencia de la activación de la vía Ahr-XRE (vía indeseada).

Es así que para confirmar que la vía molecular que se desencadena tras la exposición de las células a los derivados que resultaron activos como inductores monofuncionales es Nrf2-ARE, se estudia la localización celular de Nrf2 antes y después del tratamiento con los compuestos por técnicas de inmunocitoquímica. En la tabla 3.11 se presenta un ejemplo representativo de la inmunotinción de Nrf2 luego del tratamiento durante 6h con los derivados **SI-1**, **SI-2**, **SII-1**, **SIII-2** y **SIII-5**.

Tabla 3.11. Localización de Nrf2 en células Hepa1c1c7 luego de 6h de tratamiento con **SI-1**, **SI-2**, **SII-1**, **SIII-2** y **SIII-5**.

Compuestos	Anti-Nrf2	Hoechst 33258
t-BHQ		
SI-1		
SI-2		
SII-1		
SIII-2		
SIII-5		

Las células Hepa1c1c7 fueron crecidas en portaobjetos e inmunoteñidas con anti-Nrf2 seguido del anticuerpo secundario Alexa 488 (verde). Los núcleos fueron teñidos con Hoechst 33258 (azul). *t*-BHQ: control positivo.

Las células Hepa1c1c7 son tratadas a la concentración de CD determinada previamente y como se muestra en la tabla 3.11. En todos los casos se observa una marcada tinción nuclear de Nrf2 luego del tratamiento, comparable e incluso mayor al del control positivo *t*-BHQ. Al ser *t*-BHQ estructuralmente disímil a las chalconas ensayadas esta pequeña diferencia en la tinción observada puede deberse a que la cinética de internalización

celular sea diferente y por tanto los tiempos para desencadenar el efecto requerido (translocación nuclear de Nrf2) sean también diferentes.

DETERMINACIÓN DE CITOTOXICIDAD SOBRE LINEAS CELULARES TUMORALES

Para analizar la capacidad antitumoral de los compuestos estudiados se evaluó la citotoxicidad de los análogos sintéticos de flavonoides frente a tres líneas celulares tumorales de diferente origen. Este diseño, utilizado por el National Cancer Institute, USA (NCI, por sus siglas en inglés),^{101,102} facilita la búsqueda de nuevos compuestos con potencial actividad antitumoral que sean específicos de una línea o conjunto de líneas celulares. La citotoxicidad de los compuestos evaluados se expresa como el porcentaje de supervivencia (% sup) de las células tumorales tratadas durante 24 h con los flavonoides sintéticos a una concentración final de 1×10^{-4} M.

En 1999, el NCI introdujo un método de *pre-screening in vitro* en donde se utilizaba una combinación de tres líneas celulares altamente sensibles, generalmente MCF-7 (carcinoma de mama), NCI-H460 (carcinoma de pulmón) y SF-268 (glioma), o MCF-7, HT-29 (adenocarcinoma de colon) y TK-10 (carcinoma renal). Este ensayo surge porque el 85% de los 80.000 compuestos evaluados hasta ese entonces por el NCI, utilizando el tradicional panel de 60 líneas celulares, no mostraban actividad antiproliferativa en estas líneas. De esta forma, utilizando este *pre-screening in vitro* a escala laboratorio se es más eficiente removiendo compuestos inactivos sin necesidad de una evaluación a gran escala más costosa como lo era con el panel de 60 líneas.

En el presente trabajo todos los compuestos fueron evaluados sobre las líneas MCF-7 y HT-29 y eventualmente sobre la línea TK-10 (no disponible durante todas las etapas del mismo).

Cuando se analizan los resultados presentados en la figura 3.15 se puede agrupar a los compuestos en cuatro categorías:

- alta citotoxicidad en ambas líneas celulares (% sup < 50)
SI-1, SI-2, SI-7, SI-8, SI-9, SII-2, SIII-1, SIII-2, SIII-4, SIII-6, SIII-7, SIII-9
- baja citotoxicidad en ambas líneas celulares (% sup > 50)
SI-3D, SI-4, SI-6, SI-8A, SI-10, SI-11, SII-4, SII-6A, SII-7, SII-8, SII-9, SIII-3, SIII-8
- citotóxicos selectivos frente a MCF-7
SI-3, SII-5, SIII-5
- citotóxicos selectivos frente a HT-29
SI-8, SII-1, SII-3, SIII-6

De lo anterior se desprenden tres conclusiones generales: 1) la mayoría de los compuestos de la serie III (67 %) son muy citotóxicos frente a ambas líneas ensayadas probablemente debido a la presencia de heterociclos N-

¹⁰¹ Suggitt, M.; Bibby, M.C. 50 years of preclinical anticancer drug screening: empirical to target-driven approaches. *Clin. Cancer Res.*, 2005, 11: 971-981.

¹⁰² Skehan, P.; Storeng, R.; Scudiero, D.; Monks, A.; McMahon, J.; Vistica, D.; Warren, J.T.; Bokesch, H.; Kenney, S.; Boyd, M.R. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J. Nat. Cancer Inst.*, 1990, 82, 13: 1107-1112.

oxidados como anillo B; 2) la mayoría de los compuestos de la serie II (63%) son poco citotóxicos frente a ambas líneas; 3) los compuestos de la serie I son en general o bien muy citotóxicos (42 %) o bien inactivos (50 %).

Además, analizando más detalladamente se observa que: 1) todos los derivados ensayados que carecen del sistema de 1,4-Michael son poco citotóxicos, estos son **SI-3D**, **SI-8A**, **SII-6A**; 2) las chalconas conteniendo o-hidroxifenilo como anillo A y bromopiridinilo como anillo B (**SII-1**, **SII-3** y **SII-4**) poseen citotoxicidad selectiva hacia la línea HT-29 que desaparece completamente cuando el anillo A se sustituye por hidroxinaftilo (**SII-4**); 3) solamente tres derivados mostraron selectividad citotóxica frente a MCF-7 pertenecientes a las tres series evaluadas sin mostrar además aparente relación estructura-actividad, se trata de compuestos conteniendo naftilo (**SI-3**), quinolino (**SII-5**) o fenilfuroxanilo (**SIII-5**) como anillo B y fenilo o hidroxifenilo a modo de anillo A (figura 3.15).

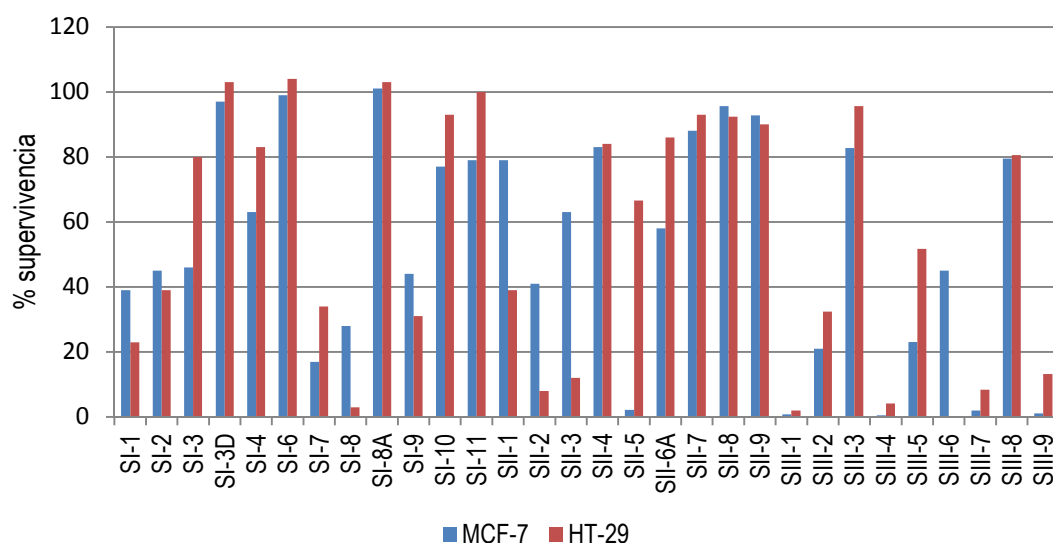


Figura 3.15. Citotoxicidad a 100 μM , expresada como % de supervivencia frente a las líneas celulares tumorales MCF-7 y HT29.

Se presenta en la tabla 3.12 las IC_{50} de algunos derivados que resultaron interesantes, se incluye además en este caso el estudio sobre la línea TK-10.

Tabla 3.12. IC_{50} sobre la líneas tumorales TK-10, MCF7 y HT-29 de las chalconas más citotóxicas.

Compuesto	IC_{50}^a (μM)		
	TK-10	MCF-7	HT-29
SI-1	14	ND ^b	ND ^b
SI-7	20	61	ND ^b
SI-8	ND ^b	28	32
SII-1	26	ND ^b	ND ^b
SII-2	18	ND ^b	48
SII-3	20	ND ^b	53
SIII-2	ND ^b	90	81
SIII-3	ND ^b	21	16
SIII-7	ND ^b	26	22

^a IC_{50} : concentración que produce 50 % de citotoxicidad. ^b ND: no determinado.

La citotoxicidad *per se* frente a líneas tumorales de compuestos con potencialidad como agentes quimiopreventivos para el cáncer puede ser de gran interés por lo que mayores estudios son necesarios en esta área.

ESTUDIOS DE MUTAGENICIDAD MEDIANTE TEST DE AMES

El estudio de la aparición de revertientes de bacterias *Salmonella thyphimurium* His⁻ (test de Ames) frente a la administración de un compuesto permite determinar la capacidad mutagénica del mismo.¹⁰³ En este trabajo se utilizó la cepa TA98 y la mutagenicidad de las chalconas se evaluó en ausencia y presencia de activación metabólica (10% mezcla S9) empleando 5 concentraciones diferentes del compuesto (la dosis máxima se determinó de acuerdo a la solubilidad de cada compuesto y teniendo en cuenta que no fuese tóxico para las bacterias). En cada ensayo se incluyó un control negativo (DMSO) y un control positivo en el cual las bacterias se cultivaron en presencia del mutágeno 4-nitro-*o*-fenilendiamina (NPD, sin activación metabólica) o 2-aminofluoreno (2-AF, con activación metabólica). Un compuesto se considera mutagénico si el número de revertientes es al menos 2 veces mayor que el del control negativo y mantiene una relación directa dosis-respuesta.¹⁰⁴ En este ensayo se evaluaron los derivados de interés: **SI-1-4**, **SI-6-11**, **SI-3D**, **SI-8D**, **SII-1-5**, **SII-9**, **SIII-1-2** y **SIII-5-7**.

Los resultados de los compuestos evaluados mediante este test son sumamente prometedores dado que solamente un compuesto, **SIII-6**, de todos los evaluados resulta ser mutagénico. Se trata además de un Bfx, heterociclo evidenciado por nuestro grupo como farmacofórico para esta actividad no deseada. Nuestro grupo posee experiencia en el estudio de mutagenicidad de *N*-óxidos de quinoxalinas, furoxanos y benzofuroxanos entre otros agrupamientos. En el caso particular de los benzofuroxanos que han mostrado ser mutagénicos parece ser que los metabolitos *o*-nitroanilinas generados tras la incubación con fracción S9 son los responsables de esta actividad. En el caso concreto de **SIII-6** la mutagenicidad observada es revertida cuando se preincuba el compuesto con una mezcla 10 % S9, por lo que es de esperar que los metabolitos que se generan en estas condiciones no sean mutagénicos, tabla 3.15 y figura 3.16. Un posible metabolito de **SIII-6** es el benzofurazano correspondiente **SIII-6R** resultante de la reducción del *N*-óxido, su mutagenicidad no fue evaluada en este trabajo pero sistemas similares suelen ser no mutagénicos. Por otra parte también se ha evidenciado que los sustituyentes unidos al benzofuroxano también pueden incidir a favor o no de la mutagénesis. Por ejemplo pueden impedir ya sea por factores estéricos o electrónicos que el benzofuroxano sea metabolizado a la correspondiente *o*-nitroanilina.¹⁰⁵

¹⁰³ Bacterial reverse mutation test. OECD Guideline for testing of chemicals: 1997, N° 471.

¹⁰⁴ Maron, D.M.; Ames, B.N. Revised methods for *Salmonella* mutagenicity test. *Mutat. Res.* 1983, 113: 173-215.

¹⁰⁵ Cabrera M.; Lavaggi, M.L.; Hernández, P.; Merlino, A.; Gerpe, A.; Porcal, W.; Boiani, M.; Ferreira, A.; Monge, A.; López de Cerain, A.; González, M.; Cerecetto, H. Cytotoxic, mutagenic and genotoxic effects of new anti-*T. cruzi* 5-phenylethenylbenzofuroxans. Contribution of phase I metabolites on the mutagenicity induction. *Toxicol. Lett.*, 2009, 190:140-149.

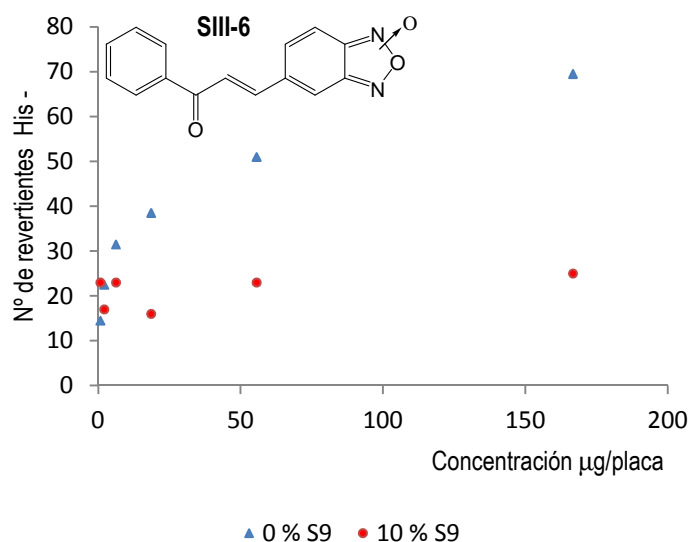


Figura 3.16. Test de Ames para el compuesto **SIII-6**, en la cepa TA98 en ausencia (0% S9) y presencia de activación metabólica (10% S9).

Tabla 3.13. Test de Ames, se indica el número de colonias revertientes His⁻ de *S. typhimurium* TA98 para compuestos de la serie **SI**.

Ref.	Dosis (µg/placa)	NR ^a ± DE		Ref.	Dosis (µg/placa)	NR ^a ± DE	
		0 % S9	10 % S9			0 % S9	10 % S9
SI-1	500	12 ^d	15 ± 1	SI-3D	56	14 ± 1	15 ± 7
	50	7 ^d	18 ± 5		19	11 ± 2	18 ± 2
	5	14 ^d	15 ± 10		6	12 ± 3	20 ± 2
	0.5	17 ^d	15 ± 4		2	9 ± 1	17 ± 1
	0.05	9 ^d	16 ± 10		1	10 ± 3	21 ± 8
SI-2	167	13 ± 2	12 ± 0	SI-4	500	cristales	cristales
	56	12 ± 1	13 ± 3		50	13 ± 6	17 ± 6
	19	10 ± 5	22 ± 4		5	9 ± 0	20 ± 1
	6	12 ± 2	21 ± 1		0.5	9 ± 1	14 ± 1
	2	13 ± 2	15 ± 2		0.05	13 ± 3	14 ± 4
SI-3	2000	18 ± 11	10 ± 4	SI-6	167	9 ± 4	11 ± 0
	200	17 ± 7	19 ± 5		56	17 ± 5	14 ^d
	20	8 ± 1	13 ± 1		19	12 ± 1	15 ± 7
	2	14 ± 2	22 ± 1		6	15 ± 4	20 ± 1
	0.2	10 ± 1	14 ± 4		2	18 ± 1	26 ± 0

Tabla 3.13. continuación

Ref.	Dosis ($\mu\text{g/placa}$)	NR ^a \pm DE		Ref.	Dosis ($\mu\text{g/placa}$)	NR ^a \pm DE	
		0 % S9	10 % S9			0 % S9	10 % S9
SI-7	500	12 \pm 1	14 \pm 2	SI-9	2000	92 \pm 6	cristales
	167	14 \pm 1	18 \pm 4		200	11 \pm 2	8 \pm 3
	56	8 \pm 0	17 \pm 7		20	8 \pm 1	17 \pm 3
	19	13 \pm 2	14 \pm 3		2	10 \pm 2	15 \pm 8
	6	10 \pm 4	23 \pm 4		0.2	12 \pm 1	12 \pm 4
SI-8	500	17 \pm 2	18 \pm 4	SI-10	2000	52 \pm 19	12 \pm 1
	167	25 \pm 7	17 \pm 6		200	10 \pm 1	15 \pm 8
	56	23 \pm 4	18 \pm 2		20	10 \pm 5	15 \pm 4
	19	16 \pm 6	20 \pm 1		2	17 \pm 8	18 \pm 1
	6	11 \pm 3	16 \pm 1		0.2	14 \pm 4	18 \pm 7
SI-8D	167	15 \pm 7	19 \pm 5	SI-11	500	8 ^d	11 \pm 2
	56	7 \pm 0	30 \pm 6		50	11 ^d	17 \pm 2
	19	18 \pm 1	14 \pm 2		5	9 ^d	13 \pm 0
	6	17 \pm 5	23 \pm 7		0.5	9 ^d	12 \pm 8
	2	19 \pm 5	19 \pm 1		0.05	11 ^d	20 \pm 4
DMSO ^b	---	21 \pm 4	25 \pm 5	DMSO ^b	---	21 \pm 4	25 \pm 5
C(+) ^c	20 NPD	1434 \pm	801 \pm 82	C(+) ^c	20 NPD	1434 \pm	801 \pm 82
	10 2-AF	139			10 2-AF	139	

^a NR: número de revertientes promedio ($n=2$) \pm desviación estándar (DE). ^b DMSO: (C-): control negativo. ^c C(+): NPD: 4-nitro-o-fenilendiamina (control positivo 0 % S9); 2-AF: 2-amino fluoreno (control positivo con 10% S9). ^d No se tiene el duplicado. NOTA: Un compuesto se considera mutagénico si supera en al menos 2 veces el NR respecto al (C-) y produce un efecto dosis respuesta.

Tabla 3.14. Test de Ames, se indica el número de colonias revertientes His⁻ de *S. typhimurium* TA98 para compuestos de la serie SII.

Ref.	Dosis (µg/placa)	NR ^a ± DE		Ref.	Dosis (µg/placa)	NR ^a ± DE	
		0 % S9	10 % S9			0 % S9	10 % S9
SII-1	100	12 ± 6	19 ± 4	SII-4	100	16 ± 6	19 ± 6
	33.3	17 ± 4	20 ± 2		33.3	17 ± 6	20 ± 2
	11.1	11 ± 5	19 ± 3		11.1	11 ± 0	17 ± 0
	3.7	17 ± 1	23 ± 1		3.7	15 ± 2	16 ± 6
	1.2	17 ± 0	18 ± 5		1.2	13 ± 5	15 ± 1
SII-2	100	9 ± 3	22 ± 4	SII-5	500	15 ± 3	10 ± 2
	33.3	12 ± 3	19 ± 1		167	18 ± 4	13 ± 2
	11.1	9 ^d	16 ± 1		56	12 ± 3	12 ± 2
	3.7	11 ± 4	16 ± 1		19	11 ± 3	10 ± 2
	1.2	11 ± 4	15 ± 7		6	15 ± 4	9 ± 2
SII-3	100	24 ± 1	18 ± 6	SII-7	500	11 ± 4	precipita
	33.3	15 ± 4	14 ± 1		167	10 ± 4	19 ± 3
	11.1	18 ± 2	15 ± 1		56	11 ± 2	17 ± 2
	3.7	10 ± 1	16 ± 0		19	16 ± 3	14 ± 0
	1.2	9 ± 2	15 ± 1		6	9 ± 3	12 ± 0
SII-8	500	18 ± 3	8 ± 4	SII-9	500	12 ± 2	6 ± 2
	167	17 ± 1	9 ± 2		167	14 ± 3	8 ± 6
	56	13 ± 2	9 ± 2		56	10 ± 3	11 ± 5
	19	13 ± 4	10 ± 4		19	12 ± 3	10 ± 5
	6	11 ± 4	11 ± 3		6	13 ± 1	9 ± 2
DMSO ^b	---	21 ± 4	25 ± 5	DMSO ^b	---	21 ± 4	25 ± 5
C(+) ^c	20 NPD 10 2-AF	1434 ± 139	801 ± 82	C(+) ^c	20 NPD 10 2-AF	1434 ± 139	801 ± 82

^a NR: número de revertientes promedio (n=2) ± desviación estándar (DE). ^b DMSO: (C-): control negativo. ^c C(+): NPD: 4-nitro-o-fenilendiamina (control positivo sin S9); 2-AF: 2-amino fluoreno (control positivo con 10% S9). ^d No se tiene el duplicado. NOTA: Un compuesto se considera mutagénico si supera en al menos 2 veces el NR respecto al (C-) y produce un efecto dosis respuesta.

Tabla 3.15. Test de Ames, se indica el número de colonias revertientes His⁻ de *S. typhimurium* TA98 para compuestos de la serie SIII.

Ref.	Dosis (µg/placa)	NR ^a ± DE		Ref.	Dosis (µg/placa)	NR ^a ± DE	
		0 % S9	10 % S9			0 % S9	10 % S9
SIII-1	500	toxicidad	9 ± 1	SIII-6	167	70 ± 4	25 ^d
	167	8 ± 3	10 ± 1		56	51 ± 6	23 ^d
	56	12 ± 3	12 ± 2		19	39 ± 1	16 ^d
	19	9 ± 3	11 ± 2		6	32 ± 2	23 ^d
	6	9 ± 2	9 ± 3		2	23 ± 8	17 ^d
SIII-2	40	8 ± 1	9 ± 1	SIII-7	500	11 ± 4	8 ± 3
	13	7 ± 1	12 ± 2		167	10 ± 4	9 ± 3
	4	7 ± 1	12 ± 3		56	11 ± 2	11 ± 2
	1	9 ± 2	12 ± 4		19	9 ± 3	10 ± 3
	0,5	12 ± 3	11 ± 3		6	12 ± 3	8 ± 1
SIII-5	400	16 ± 5	10 ± 2				
	133	10 ± 3	13 ± 4				
	44	12 ± 3	9 ± 1				
	15	8 ± 1	13 ± 3				
	5	9 ± 2	13 ± 3				
DMSO ^b	---	21 ± 4	25 ± 5	DMSO ^b	---	21 ± 4	25 ± 5
C(+) ^c	20 NPD 10 2-AF	1434 ± 139	801 ± 82	C(+) ^c	20 NPD 10 2-AF	1434 ± 139	801 ± 82

^a NR: número de revertientes promedio (n=2) ± desviación estándar (DE). ^b DMSO: (C-): control negativo. ^c C(+): NPD: 4-nitro-o-fenilendiamina (control positivo sin S9); 2-AF: 2-amino fluoreno (control positivo con 10% S9). ^d No se tiene el duplicado. NOTA: Un compuesto se considera mutagénico si supera en al menos 2 veces el NR respecto al (C-) y produce un efecto dosis respuesta.

ENSAYO DEL COMETA

El test del cometa, o electroforesis en gel de células individuales, es uno de los ensayos más utilizados para detectar microscópicamente daño al ADN a nivel celular. El ADN dañado tiende a fragmentarse y al someterse a electroforesis migra separándose del núcleo celular, generando una nube que se asemeja a la cola de un cometa. La extensión de la misma aumenta con el grado de fragmentación del ADN, siendo indicativa del daño generado. Según su longitud los núcleos se agrupan en 5 categorías, del 0 al 4, donde 0 representa la ausencia de cola (ADN no dañado) y 4 corresponde a aquellos con la cola más larga (ADN completamente fragmentado). Por cada compuesto se realiza un ensayo donde se asignan categorías a 100 núcleos y el daño total se calcula con la siguiente ecuación: (% núcleos clase 0 x 0) + (% núcleos clase 1 x 1) + (% núcleos clase 2 x 2) + (%

núcleos clase 3 x 3) + (% núcleos clase 4 x 4), midiéndose entre 0 y 400 unidades arbitrarias (ver figuras 3.17 y 3.18).

Los compuestos fueron evaluados a 20 μ M sobre células HK-2. La dosis elegida de 20 μ M para testear el daño producido por los compuestos es mayor que el valor CD en Hepa1c1c7 y BprC1 de aquellos que resultaron activos. A su vez el ensayo fue realizado sobre células HK-2 (células epiteliales renales, no tumorales), ya que se había observado citotoxicidad selectiva en nuestros antecedentes frente a la línea renal tumoral TK-10 (ver figura 2.1., Antecedentes).

Se presentan a continuación en las tablas 3.16 y 3.17 los derivados evaluados en este ensayo: tabla 3.16 (todos los compuestos obtenidos en la serie I); tabla 3.17 las chalconas **SII-1 – SII-4**, y **SII7** pertenecientes a la serie II, quedando pendiente la evaluación de los derivados de la serie III.

Como puede apreciarse ningún compuesto de los evaluados produce daño al ADN, ya que ninguno sobrepasó las 60 unidades arbitrarias de daño, por lo que estos estudios de genotoxicidad también son muy auspiciosos. Cabe destacar que el peróxido de hidrógeno produce un daño cercano a las 400 UA.

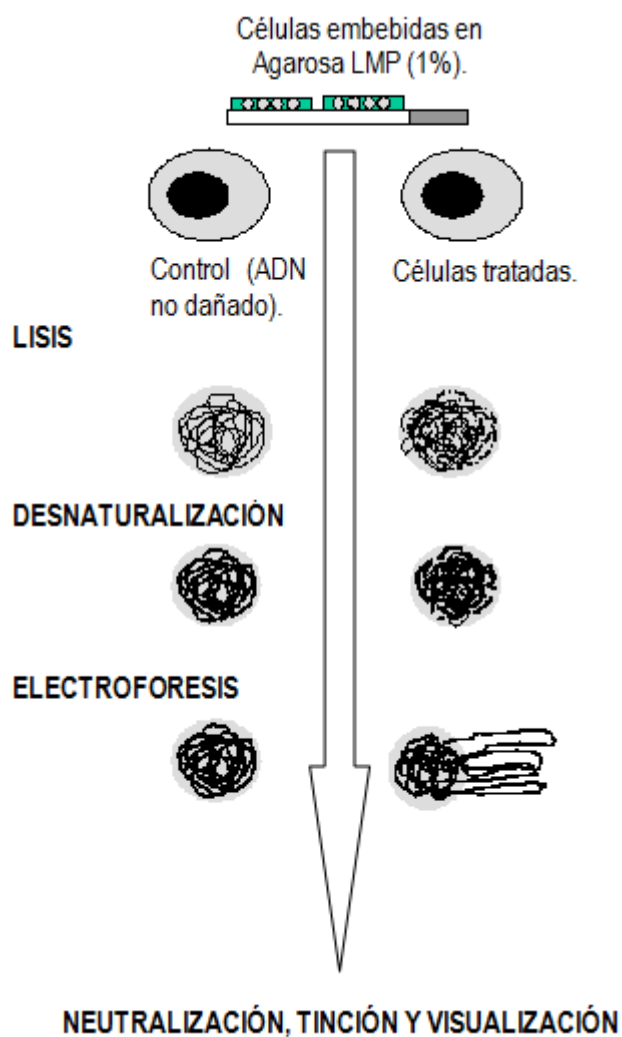


Figura 3.17. Esquema general del ensayo del cometa sobre células HK-2.

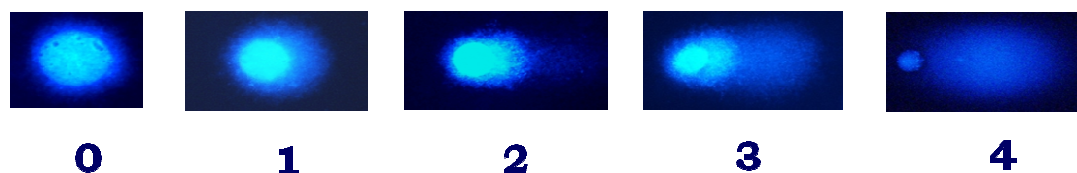


Figura 3.18. Clasificación de los cometas según criterio de Collins.¹⁰⁶

Tabla 3.16. Electroforesis alcalina en gel de células individuales HK-2 (ensayo del cometa). Se indica el daño al ADN, en unidades arbitrarias, producido por los compuestos pertenecientes a la **Serie I**.^a

Compuesto	Número de cometas en cada categoría					UA ^b
	0	1	2	3	4	
SI-1	82	14	1	4	0	27
SI-2	82	11	4	2	1	25
SI-3	82	14	2	1	2	27
SI-3D	80	14	4	2	2	33
SI-4	85	6	3	5	2	32
SI-6	87	8	4	1	1	22
SI-7	85	7	1	6	2	34
SI-8	91	4	3	1	1	17
SI-8A	81	10	3	5	2	37
SI-9	88	10	2	1	0	16
SI-10	90	6	2	2	1	16
SI-11	87	10	2	1	1	16
C (-) ^c	81	16	1	2	0	24
C(+) ^d	0	2	1	61	36	331

^a Los compuestos fueron ensayados a 20 μM . ^b UA: unidades arbitrarias de daño, 100 núcleos por microgel fueron clasificados en cometas de 0-4 según su intensidad de fluorescencia en la cabeza y en la cola, $0 \leq \text{UA} \leq 400$. ^c C(-): DMSO, control negativo. ^d C(+): las células HK-2 fueron tratadas con H_2O_2 50 μM , sobre hielo, durante 15 min, control positivo.

¹⁰⁶ Collins, A.R.; Ma, A.G.; Duthie, S.J. The kinetics of repair of oxidative DNA damage (strand breaks and oxidised pyrimidine) in human cells. *Mutat. Res.* 1995, 336: 69-77.

Tabla 3.17. Electroforesis alcalina en gel de células individuales HK-2 (ensayo del cometa). Se indica el daño al ADN, en unidades arbitrarias, producido por los compuestos pertenecientes a la **Serie II**.^a

Compuesto	Número de cometas en cada categoría					UA ^b
	0	1	2	3	4	
SII-1	88	4	1	5	2	29
SII-2	82	6	2	8	3	45
SII-3	69	14	9	6	3	59
SII-4	82	14	4	1	1	26
SII-7	86	7	1	4	2	28
C (-) ^c	81	16	1	2	0	24
C(+) ^d	0	2	1	61	36	331

^a Los compuestos fueron ensayados a 20 μ M. ^b UA: unidades arbitrarias de daño, 100 núcleos por microgel fueron clasificados en cometas de 0-4 según su intensidad de fluorescencia en la cabeza y en la cola, 0 \leq UA \leq 400. ^c C(-): DMSO, control negativo. ^d C(+): las células HK-2 fueron tratadas con H₂O₂ 50 μ M, sobre hielo, durante 15 min, control positivo.

ESTUDIOS IN VIVO

Los compuestos **SI-1**, **SII-1**, **SIII-2** y **SIII-5** fueron seleccionados para estudiar su efectividad *in vivo* ya que como se discutió anteriormente fueron los que presentaron mejor perfil en los ensayos preliminares *in vitro*. Estos compuestos provocaron una buena inducción en las líneas Hepa1c1c7 y BprC1 en el *screening* primario, son inductores monofuncionales, mostraron los mejores valores de CDs y buenos índices de quimioprevención. Además en estudios de inmunocitoquímica se confirma que son capaces de inducir la translocación de Nrf2 al núcleo después de 6 horas de incubación. Todos resultaron ser no mutagénicos en ensayo de Ames y para **SI-1** y **SII-1** se demostró que no causan daño al ADN en células mamíferas.

En el ensayo *in vivo* se administraron los compuestos durante 2 semanas por vía oral a razón de 15 mg/kg peso vivo mediante el uso de sonda intragástrica, para luego cuantificar actividad enzimática QR y GST en la fracción citosólica de hepatocitos y además reafirmar que no se sobreexpresan las isoformas de CYP1A1 y CYP1A2 a través de la cuantificación de actividad EROD en fracción microsomal de hepatocitos. Se estudia también la capacidad de inducir QR y GST en fracción citosólica de colon y mama como forma de determinar la capacidad moduladora de enzimas detoxificantes en otros tejidos potenciales blancos quimiopreventivos.

Como control positivo se eligió **FV4Br**, cuya capacidad inductora ha sido anteriormente descrita (ver figura 2.1, Antecedentes).¹⁰⁷ Al final del experimento los animales fueron sacrificados mediante dislocación cervical para luego proceder a la disección y colectado de hígado, glándula mamaria y colon. El protocolo se ajustó al espíritu de los principios de cuidado de animales de laboratorio y a la ley Nacional sobre experimentación animal.^{108,109}

¹⁰⁷ Song, L. L.; Kosmeder II, J. W.; Kook Lee, S.; Gerhäuser, C.; Lantvit, D.; Moon, R. C.; Moriarty, R. M.; Pezzuto, J. M. Cancer chemopreventive activity mediated by 4'-bromoflavone, a potent inducer of phase II detoxification enzymes. *Cancer Res.* 1999, 59: 573-585.

¹⁰⁸ Morton, D.B.; Griffiths, P.H.M. Guidelines on the recognition of pain, distress and discomfort in experimental animals and a hypothesis for assessment. *Vet. Rec.* 1985, 116:431-436.

¹⁰⁹ Ley N° 18.611. Utilización de animales en actividades de experimentación, docencia e investigación científica. Uruguay, D.O. 21 oct/009- N°27840.

Tabla 3.18. Modulación de enzimas de fase I y II *in vivo* por los compuestos **SI-1**, **SII-1**, **SIII-2** y **SIII-5**.

Compuesto	Tejido	% Inducción enzimática		
		QR	GST	CYP
SI-1	Hígado	11	10	30 ^a
	Colon	2	5	4
	Mama	0	5	7
SII-1	Hígado	25 ^a	29 ^a	10
	Colon	11	16 ^a	9
	Mama	13 ^b	10	11
SIII-2	Hígado	80 ^a	110 ^a	40 ^a
	Colon	5	4	5
	Mama	6	10	4
SIII-5	Hígado	110 ^a	180 ^a	60 ^a
	Colon	12 ^b	18 ^a	15
	Mama	8	13 ^b	11

^a: $p < 0,05$ ^b: $p < 0,1$

Según se presenta en la tabla 3.18, todos los compuestos inducen QR y GST hepáticas en el siguiente orden **SIII-5>SIII-2>SII-1>SI-1**, los primeros tres lo hacen de forma muy significativa ($p < 0,05$). El derivado **SI-1** incrementa los niveles enzimáticos de fase II levemente respecto al control negativo sin embargo lo hace de forma significativa para los niveles de CYP testados, podemos decir entonces que **SI-1** tiene un comportamiento de carácter bifuncional, misma tendencia que mostraban los valores de CD determinados *in vitro*.

Los compuestos **SIII-2** y **SIII-5** muestran un comportamiento similar, ambos son excelentes inductores de enzimas de fase II, aumentando más los niveles de GST que los de QR y en menor medida los de CYP. A diferencia de **SI-1**, los compuestos **SIII-2** y **SIII-5** son claros inductores netos monofuncionales *in vitro*. Igualmente los niveles de GST alcanzados en ambos casos prácticamente triplican los de CYP por lo que podemos definir a **SIII-2** y **SIII-5** como inductores monofuncionales *in vivo*. Es interesante destacar que además el derivado **SIII-5** provoca sobreexpresión, estadísticamente significativa, de enzimas de fase II en mama y colon.

El compuesto **SII-1** posee un comportamiento intermedio, produciendo un aumento de entre el 25-30 % en enzimas detoxificantes de xenobióticos de fase II, lo cual es un resultado prometedor, en línea con los resultados *in vitro*, y que además no parece alterar de forma significativa la actividad EROD producida por CYP. Cuando se analiza la relevancia estadística de estos resultados se puede afirmar que los resultados son significantes ($p < 0,05$) para el caso de QR y GST hepáticas. También los niveles de GST en colon y QR en mama se ven aumentados significativamente en los animales tratados con **SII-1** (ver tabla 3.18).

El hecho de que los compuestos no se comporten igual que en la pruebas *in vitro* puede deberse a muchos factores, probablemente relacionados con la absorción, distribución, metabolización entre otros que impiden que los compuesto no alcancen el sitio de acción a la concentración necesaria para ejercer el efecto.

Cabe destacar que si bien no se realizaron estudios de toxicidad aguda (dosis única) ni crónica (dosis repetida) la toxicidad de los productos se evaluó preliminarmente comparando la ganancia de peso de las ratas tratadas con el grupo control. En este sentido se tomaron los pesos diariamente desde el inicio del tratamiento hasta el día del sacrificio. De forma de normalizar los resultados, el aumento de peso se expresó como la ganancia

porcentual de peso con respecto al día 0 de tratamiento a la mitad del tratamiento y al momento del sacrificio. Para las dosis y períodos de tiempo evaluados no se observaron diferencias significativas en la ganancia de peso entre ambos grupos para ninguno de los compuestos. Esta observación, sumada con estudios previos de nuestro grupo sobre flavonoides análogos que no exhibían toxicidad apreciable *in vivo*, y los resultados de estudios de toxicidad *in vitro*, apoyan el uso de estos compuestos a las dosis evaluadas *in vivo*.

PARTE EXPERIMENTAL BIOLÓGICA

GENERALIDADES

Los reactivos empleados fueron de origen comercial sin posterior purificación: SIGMA, ALDRICH, JANSSEN, MERCK, FLUKA, entre otros. Se obtuvieron de Sigma, Tripsina-EDTA, Penicilina-Estreptomicina (P/E), PBS sin calcio ni magnesio. Los medios de cultivo para células y el Suero Fetal Bovino (SFB) se obtuvieron de Gibco (Carlsbad, EUA). Los medios de cultivo para bacteria se obtuvieron de Oxoid (Cambridge, UK).

Las medidas de pH se efectuaron en un equipo Orion pHmeter Model 420A. Las centrifugaciones y ultracentrifugaciones se llevaron a cabo en un equipo Sigma 3K18 o Eppendorf 5804R y Beckman L7-65 Ultracentrifuge, respectivamente. También se utilizó una microcentrífuga Eppendorf mini spin. Se utilizó un microscopio de epifluorescencia IX81 Olympus. Para las medidas de espectrofotometría se utilizó el equipo Varian Cary 50 Tablet, UV-visible Spectrophotometer y para las medidas de espectrofotometría de fluorescencia el equipo Varian Cary Eclipse, Fluorescence Spectrophotometer. El lector de placas empleado fue Thermo, Varioskan Flash. El sonicador de vástago fue Branson Digital Sonifier.

EXPERIMENTACIÓN EN LÍNEAS CELULARES

Todas las líneas celulares mamíferas se cultivaron a 37 °C en una atmósfera húmeda con 5% de CO₂. Para las líneas celulares continuas epiteliales humanas MCF-7 (ATCC® HTB-22, derivada de adenocarcinoma de mama), HT-29 (ATCC® HTB-38, derivada de adenocarcinoma colorectal), se utilizó medio DMEM suplementado con 10 % v/v SFB en presencia de 100 U/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomicina, al igual que para la línea murina BpRc1 (ATCC® CRL-2217, derivada de hepatoma). En el caso de TK-10 (NCI, derivada de adenocarcinoma renal humano) se sustituye el medio DMEM por RPMI y se mantiene la misma suplementación. Para la línea HK-2 (ATCC® CRL-2190, derivada de células renales humanas) se utiliza medio DMEM/F-12 ya preparado suministrado por Gibco y suplementado igual que los otros medios descritos. Por último, en el caso de la línea murina Hepa1c1c7 (ATCC® CRL-2026 derivada de hepatoma) se utilizó medio MEM alpha, sin nucleósidos, suplementado con 10 % v/v SFB en presencia de 100 U/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomicina.

La descomplementación del SFB empleado para suplementar los medios se efectuó durante 40 minutos en un baño de agua termostatzado a 56 °C. Todas estas líneas poseen crecimiento en adherencia y para el mantenimiento en cultivo se emplearon botellas de 25-75 cm² realizando pasajes de las mismas mediante tripsinización cada vez que alcanzaron la confluencia y por un máximo de 20 pasajes. Para despegar las células mediante tripsinización se retiró el medio de cultivo, se lavó la monocapa con PBS y se adicionó Tripsina-EDTA. Las células fueron incubadas durante 5 a 10 min a 37 °C, se adicionó medio de cultivo completo y se transfirió la dilución adecuada a una nueva botella de cultivo.

Criopreservación/Revitalización

Para la conservación de las líneas celulares se utilizó una mezcla crioprotectora que consiste en 10% DMSO y 90% SFB utilizando una cámara que utiliza isopropanol y permite realizar un enfriamiento progresivo de 1 °C por

minuto (Nalgene). Las líneas celulares que estaban en fase de crecimiento exponencial fueron tripsinadas, contadas y centrifugadas a 200 g durante 5 minutos. Se descartó el sobrenadante y el *pellet* celular se resuspendió en el volumen necesario de mezcla crioprotectora para obtener una concentración entre 2 y 3×10^6 cel/mL. Se dispensaron entre 1-1,5 mL de la suspensión celular por criotubo, los cuales fueron almacenados en la cámara de congelación en un freezer de -80 °C.

Para el descongelado y revitalización de las líneas celulares criopreservadas se colocó un criotubo en un baño de agua a 37 °C. Las células descongeladas se transfirieron a un tubo cónico que contenía 10 mL de medio de cultivo a 37 °C y se centrifugaron a 200 g durante 5 minutos. Se descartó el sobrenadante, el *pellet* celular se resuspendió en 1 mL de medio de cultivo y se realizó el recuento celular con el objeto de evaluar cantidad y viabilidad de las células recuperadas. Finalmente, las células fueron sembradas en botellas de 25-75 cm² según el caso.

Recuento y Evaluación de Viabilidad Celular

Se realizó el recuento celular en cámara de *Neubauer* empleando las diluciones convenientes de acuerdo con la densidad celular de la muestra. La concentración de células viables se determinó empleando el método de exclusión con Azul de Tripán en el cual el colorante se incorpora en las células muertas debido a la alteración de la integridad de la membrana plasmática. Las muestras obtenidas de los cultivos fueron incubadas con una solución de Azul de Tripán 0,5% en PBS y sembradas en la cámara.¹¹⁰

Análisis de Citotoxicidad

Se empleó el ensayo colorimétrico de sulforrodamina B¹¹¹ con las líneas celulares MCF-7, HT-29, TK-10, HK-2, Hepa1c1c7 y BprC1. Se emplean placas de 96 pocillos de fondo plano, se siembra un número adecuado de células, según la línea celular (entre 5000 y 20000 células por pocillos) en 100 µL de medio. Los cultivos se mantienen en incubación a 37 °C y 5 % de CO₂. A las 24 horas se agrega 125 µL de medio fresco. A las 24 h se añade 25 µL por pocillo del producto a ser testeado de forma de obtener la concentración final deseada, disuelto en una solución de DMSO al 10 % (concentración final en el pocillo 1×10^{-4} M). La duración del tratamiento es de 24 o 48 horas en incubación a 37 °C y 5 % de CO₂. Una vez tratadas las células, se elimina el medio junto con el producto y se lavan los pocillos dos veces con 200 µL de PBS. Las células se fijan con 50 µL de TCA al 50 % v/v y 200 µL de medio de cultivo (sin suero fetal bovino) durante una hora a 4 °C. Posteriormente se decantan y se lavan 5 veces con agua destilada. A continuación se añaden a cada pocillo 100 µL de una solución de sulforrodamina B al 0,4 % v/v en ácido acético al 1 % y se incuba durante 30 minutos a temperatura ambiente. Tras este tiempo, se lavan las placas 5 veces con 200 µL de ácido acético al 1 % v/v y se dejan secar durante toda la noche. El colorante que permanece en el pocillo se disuelve en 100 µL de Tris base 10 mM, pH 10, se

¹¹⁰ Strober, W. Trypan blue exclusion test of cell viability. *Curr. Protocol. Immunol.* 1997, 21: A.3.B.1-A.3.B2.

¹¹¹ Skehan, P.; Storeng, R.; Scudiero, D.; Monks, A.; McMahon, J.; Vistica, D.; Warren, J.T.; Bokesch, H.; Kenney, S.; Boyd, M. R. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J. Natl. Cancer Inst.* 1990, 82: 1107-1112.

agitan las placas para total disolución y se realiza la lectura en espectrofotómetro a 540 nm. El porcentaje de supervivencia se calcula como $T/C \times 100$ (T Abs células tratadas, C Abs células control).

Tratamiento y Purificación Citosólica para Screening de Actividad QR¹¹²

Se siembra 1 mL de suspensión celular a una concentración de 8.0×10^4 células por mL en placa de 24 pocillos y se incuba durante 24 h para permitir la adherencia. Se aspira el medio de los 24 pocillos y se lava dos veces con 0.5 mL de PBS. Se adiciona 1 mL de medio fresco con el compuesto a ensayar disuelto en DMSO a la dosis deseada de forma que la concentración final de DMSO sea menor o igual a 1 % v/v en pocillos por duplicado. Se adiciona control de disolvente como control negativo. Se tratan las células durante 48 h, se retira el medio, se lava dos veces con 0.5 mL de PBS y se cosechan con 0.1 mL de tripsina. La actividad de la tripsina se neutraliza con 0.9 mL de medio fresco y se transfieren las células a tubos tipo *ependorf* de 1.5 mL. Se centrifuga a $10.000 \times g$ durante 5 min a 4 °C, se descarta el sobrenadante y se resuspende el *pellet* en 0,5 mL de PBS y se centrifuga nuevamente repitiendo las mismas condiciones. Se remueve el PBS y las células son suspendidas en 0.5 mL de tampón Tris-HCl 25 mM pH 7.4. Se lisan las células por sonicación, sobre hielo picado durante 10 s, 40 % frecuencia, se adiciona Azul de Tripán y se corrobora microscópicamente que las células se hayan lisado. La suspensión del lisado celular se centrifuga a $10.000 \times g$ durante 5 min a 4 °C. Se usa el sobrenadante citosólico para medir actividad QR y/o GST.

ESTUDIOS DE MUTAGENIDAD MEDIANTE TEST DE AMES^{113,114}

El estudio de la aparición de revertientes de bacterias *Salmonella thyphimurium* His⁻ (Test de Ames) frente a la administración de un compuesto permite determinar la capacidad mutagénica del mismo. En este trabajo se utilizó la cepa TA98 provista por Moltox® y la mutagenicidad de los compuestos se evaluó en ausencia (0% mezcla S9) y presencia de activación metabólica (10% mezcla S9) empleando cinco concentraciones diferentes del compuesto (la dosis máxima se determinó de acuerdo a la solubilidad de cada compuesto y teniendo en cuenta que no fuese tóxico para las bacterias). En cada ensayo se incluyó un control negativo (DMSO) y un control positivo en el cuál las bacterias se cultivaron en presencia del mutágeno 4-nitro-*o*-fenilendiamina (NPD, sin activación metabólica) o 2-aminofluoreno (2-AF, con activación metabólica). Un compuesto se consideró mutagénico si el número de revertientes fue al menos 2 veces mayor que el del control negativo y mantenía una relación directa dosis-respuesta.

Se siembra las bacterias en 30 mL de medio líquido Oxoid n° 2, 25 g/L con un ansa estéril a partir de un criotubo conteniendo $1-3 \times 10^9$ bacterias por mL, se incuban a 37 °C durante 12 h y se prepara una suspensión de 2×10^9 bacterias por mL. El ensayo sin activación metabólica se realiza mezclando 50 µL de cada compuesto en la

¹¹² Houghton, P.; Fang, R.; Techatanawat, I.; Steventon, G.; Hyland, P.J.; Lee, C.C. The sulphorodamine (SRB) assay and other approaches to testing plant extracts and derived compounds for activities relates to reputed anticancer activity. *Methods*, 2007, 42: 377-387.

¹¹³ Maron, D.M.; Ames, B.N. Revised methods for *Salmonella* mutagenicity test. *Mutat. Res.* 1983, 113: 173-215.

¹¹⁴ Mortelmans, K.; Zeiger, E. The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay. *Mutat. Res.* 2000, 455: 29-60.

dosis a ensayar disuelto en DMSO con 500 μ L de tampón fosfato, 0,1 M, pH: 7,4 y 100 μ L de suspensión bacteriana. La mezcla se incuba 60 min, se adiciona 2 mL de agar 6.0 g/L con trazas de histidina 0,5 mM y biotina 0,5 mM y NaCl 5.0 g/L previamente termostatizado a 47 °C, se mezcla usando *vortex* y se siembra en placas de petri con medio mínimo solido conteniendo $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 7.0 g/L, KH_2PO_4 2,0 g/L $(NH_4)_2SO_4$ 1.0 g/L, $C_6H_5O_7Na_3 \cdot 2H_2O$ 0.25 g/L, glucosa 2.0 g/L, $Mg SO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1 g/L y agar 15 g/L. Cuando la mezcla de agar y suspensión bacteriana solidifica, las placas de Petri se incuban invertidas a 37 °C durante 48 h. Pasado este tiempo se cuentan las colonias revertientes. El ensayo con activación metabólica se realizó de forma similar remplazando los 500 μ L de tampón fosfato por igual volumen de mezcla S9 conteniendo fracción S9 suministrada por Moltox® 10% v/v, NADP 4,7 mM, D-glucosa-6-fosfato 6.0 mM, $MgCl_2$ 19 mM, KCl 36 mM en tampón fosfato 0.1 M, pH 7.4. Cada dosis ensayada, al igual que todos los controles se evaluaron por duplicado. Como controles positivos se utilizó 2AF 10 μ g/placa o NPD 20 μ g/placa según correspondiese.

Recuento en Placa de TA98.¹¹⁵

Para determinar el crecimiento bacteriano se utilizó la técnica de recuento en placa de Petri. Esta técnica se basa en el crecimiento y desarrollo de colonias en un medio de cultivo por lo que sólo se detectan aquellas bacterias que están viables en las condiciones de trabajo. Se utilizaron placas de agar-oxid n°2 incubadas 37 °C según el caso durante 24-48 h. Esta técnica se utilizó para correlacionar la absorbancia a 600 nm (A_{600nm}) y el crecimiento bacteriano. Se realizaron diluciones seriadas en PBS estéril de los cultivos bacterianos (1/1, 1/2, 1/4 y 1/8) y se midió la A_{600nm} . A partir de estos cultivos se sembraron diluciones en placas con el fin de obtener entre 30-300 colonias. Se sembraron por triplicado 10 μ L de la suspensión bacteriana por cada dilución. Una vez adsorbidas las gotas, las placas fueron incubadas 30 °C ó 37 °C según el caso durante 24-48 h. Se contaron las colonias presentes en cada placa y el número obtenido multiplicado por el inverso del factor de dilución corresponde al número de ufc/mL del cultivo original. Estos valores se graficaron en función de los valores de A_{600nm} , se realizó una regresión lineal y se obtuvo una ecuación de la recta para cada cepa.

ENSAYO DE COMETA O ELECTROFORESIS EN GEL DE CÉLULAS INDIVIDUALES^{116,117}

Preparación y Tratamiento de las Células. Se siembran 2 mL de suspensión celular HK-2 a una concentración de 1.0×10^5 células por mL en placa de 6 pocillos y se incuba durante 24 h para permitir la adherencia. Se aspira el medio de los 6 pocillos y se lava dos veces con 1 mL de PBS. Se adicionan 2 mL de medio fresco con el compuesto a ensayar disuelto en DMSO a la dosis deseada (10 o 20 μ M) de forma que la concentración final de DMSO sea menor o igual a 1 % v/v. Cada compuesto se ensaya por duplicado, se utiliza DMSO 1 % v/v como

¹¹⁵ Gerhardt, P.; Murray, R.G.E.; Wood, W.A.; Kreig, N.R. *Methods for general and molecular bacteriology*. Ed. American Society for Microbiology, 1ª Ed., Washington, USA. 1994, 328:330.

¹¹⁶ Collins, A. R.; Ai-guo, M.; Duthie, S.J. The kinetics of repair of oxidative DNA damage (strand breaks and oxidized pyrimidines) in human cells. *Mutat. Res.* 1995, 336: 69-77.

¹¹⁷ Cabrera, M.; Simoens, M.; Falchi, G.; Lavaggi, M.L.; Piro, O.E.; Castellano, E.E.; Vidal, A.; Azqueta, A.; Monge, A.; López de Ceráin, A.; Sagrera, G.; Seoane, G.; Cerecetto, H.; González, M. Synthetic chalcones, flavanones, and flavones as antitumor agents: biological evaluation and structure-activity relationships. *Bioorg. Med. Chem.* 2007, 15, 3356-3367.

control negativo. A las 6 h se retira el medio, se lava dos veces cada pocillo con 1 mL de PBS, se cosechan las células con 200 μ L de tripsina, se agregan 400 μ L de medio fresco y se extravasa la suspensión celular a tubos tipo *eppendorf* de 1.5 mL. Se cuentan las células utilizando una cámara de *Neubauer*, se centrifuga a 600 x g durante 5 min y se resuspende el *pellet* en PBS de forma de obtener una concentración celular de $1,0 \times 10^6$ células por mL.

Preparación de Microgeles. Se toman 30 μ L de la suspensión celular ($1,0 \times 10^6$ células por mL) y se mezclan con 140 μ L de agarosa LMP 1 % p/v en PBS previamente fundida a 37 °C. Se colocan dos gotas de 70 μ L de esta suspensión en un portaobjetos previamente recubierto con agarosa NMP 1 % p/v en agua de forma que queden separadas entre si. Se coloca un cubreobjeto sobre el cada gota de se deja en hielo por 5 minutos. Luego se retira el cubreobjetos y se coloca el portaobjeto ahora con los microgeles en una solución de lisis.

Lisis. Se lisan las células embebidas en los microgeles en una solución que contiene NaCl 2,5 M, Na₂-EDTA 100 mM, Tris base 10 mM, 1% v/v Triton X-100, pH: 10.5 durante dos horas a 4 °C.

Tratamiento Alcalino y Electroforesis. Posteriormente los microgeles en los portaobjetos se colocan en una cuba horizontal para -electroforesis y se cubren con una solución alcalina compuesta por NaOH 300 mM y Na₂-EDTA 1 mM, pH:13 de forma de desnaturalizar el ADN. Los microgeles se dejan en dicha solución por 40 minutos. A continuación se realiza la electroforesis a 300 mA durante 30 min.

Neutralización. Una vez finalizada la electroforesis, se realiza una neutralización sumergiendo los portaobjetos tres veces durante 5 min en una solución tampón Tris-HCl 400 mM, pH 7,5 a 4 °C.

Tinción y cuantificación. A cada microgel se añade 20 μ L de una solución de DAPI 1 μ g/mL y cubierto con un cubreobjetos. Se visualiza cada gel utilizando un microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse TE 300. Se cuentan un total de 100 cometas por microgel. A cada cometa se le asigna un valor de daño creciente entre 0 y 4. Se calcula un valor de daño total (*total score*) como (porcentaje de células con daño 0 x 0) + (porcentaje de células con daño 1 x 1)+ (porcentaje de células con daño 2 x 2)+ (porcentaje de células con daño 3 x 3)+ (porcentaje de células con daño 4 x 4). De esta se obtiene un *total score* que varía entre 0 y 400.

ESTUDIOS EN ANIMALES

Se emplearon ratas hembras nulíparas Wistar exocriadas de 2 meses de edad de entre 190 - 200 g de peso corporal adquiridas en la Unidad de Reactivos para Biomodelos de Experimentación, Facultad de Medicina, UdelaR. Durante los experimentos los animales se mantuvieron juntos agrupados según tratamiento en cajas plásticas suministradas por Tecniplast®, identificados mediante muescas en orejas. Los ensayos se llevaron a cabo en la Unidad de Bioterio (CIN, Facultad de Ciencias, UdelaR) luego de un periodo de aclimatación de al menos tres días, a 20 ± 2 °C con agua y alimento (suministrado por Vitaron) *ad libitum*, ciclos de luz/oscuridad de 12 h. Se administraron los productos a evaluar durante 2 semanas por vía intragástrica a través de sonda en una solución - suspensión de 0.5 mL utilizando suero fisiológico - Tween 20, 4:1, como vehículo. Esta forma de administración permite tener un control riguroso de la cantidad de producto que ingiere cada animal, de forma de independizarse de esta variable. Se evaluaron 2 concentraciones diferentes de derivados, 15 o 22.5 mg/Kg peso

vivo/día. Cada producto fue administrado a un grupo de 3 ratas por ensayo y comparado con un grupo control negativo al cual se le proporcionó únicamente el vehículo. Como control positivo se eligió la 4FVBr, cuya capacidad inductora ha sido anteriormente descrita.¹¹⁸ Al final del experimento los animales fueron sacrificados mediante dislocación cervical para luego proceder a la disección y colectado de hígado, glándula mamaria y colon. El protocolo se ajustó a los principios de cuidado de animales de laboratorio y a la ley Nacional sobre experimentación animal.^{119,120}

Purificación de Fracción Citosólica y Microsomal *in vivo*.

La fracción microsomal y citosólica fue aislada a partir de hígado de rata. El procedimiento se realizó el mismo día del sacrificio y los hígados se transportaron en una solución de NaCl 0.9 % m/v en hielo picado. Luego de extraídos los hígados se trozaron y homogeneizaron en 3 volúmenes de amortiguador Tris-HCl 0.05M con 0.25 M sacarosa pH 7.4 en frío utilizando un homogenizador de vidrio y teflón Potter-Elvehjem. El homogeneizado se centrifugó a 900 x g durante 30 min a 4 °C. Se colectó el sobrenadante y se centrifugó a 10.000 x g durante 1 h a 4 °C. Se descartó el precipitado y el sobrenadante se centrifugó a 100.000 x g durante 1 h a 4 °C. El sobrenadante obtenido se utilizó como fracción citosólica. El *pellet* se lavó con el tampón Tris-HCl 0,05M con 0,25 M sacarosa pH 7,4 y fue recentrifugado a 100.000 x g durante 1 h a 4 °C de forma de eliminar trazas de fracción citosólica. El precipitado obtenido se resuspendió en 1 mL de amortiguador Tris-HCl 0.05M con 0,25 M sacarosa pH 7.4. La fracción microsomal se utilizó para cuantificar actividad EROD, mediada por CYP1A1 y la fracción citosólica para cuantificar actividad QR y GST. Para aislar fracción citosólica partiendo de colon o glándula mamaria, el procedimiento varió en las etapas finales. Luego de trozados y homogenizados los órganos en las mismas condiciones descritas arriba se realizó un único paso de centrifugación a 100.000 x g durante 1 h a 4 °C y el sobrenadante obtenido se utilizó como fracción citosólica para cuantificar actividad QR y GST. A todas las fracciones se le cuantificó la concentración proteica previo a su uso.

DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD QUINONA REDUCTASA.

El ensayo de actividad quinona reductasa microsomal se realizó según el protocolo de Jiang y colaboradores con pequeñas modificaciones.¹²¹ Se utiliza como sustrato 2,6-diclorofenolindofenol (DCPIP) y se mide el decremento en la absorbancia a 600 nm provocado por la reducción de DCPIP ($\epsilon=20.5 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) por QR. La mezcla de

¹¹⁸ Song, L. L.; Kosmeder II, J. W.; Kook Lee, S.; Gerhäuser, C.; Lantvit, D.; Moon, R. C.; Moriarty, R. M.; Pezzuto, J. M. Cancer chemopreventive activity mediated by 4'-bromoflavone, a potent inducer of phase II detoxification enzymes. *Cancer Res.* 1999, 59: 573-585.

¹¹⁹ Morton, D.B.; Griffiths, P.H.M. Guidelines on the recognition of pain, distress and discomfort in experimental animals and an hypothesis for assessment. *Vet. Rec.* 1985, 116:431-436.

¹²⁰ Ley N° 18.611. Utilización de animales en actividades de experimentación, docencia e investigación científica. Uruguay, D.O. 21 oct/009- N°27840.

¹²¹ Jiang, Z.; Chen, C.; Yang, B.; Hebbar, V.; Kong, A. Differential responses from seven mammalian cell lines to the treatments of detoxifying enzyme inducers. *Life Science.* 2003, 72: 2243-2253.

reacción contenía amortiguador Tris-HCl (25 mM, pH 7.4), 1.5 mg de seroalbúmina bovina (BSA), 2.5 μ L Tween (20%), FAD (5 μ M final), NADH (0.2 mM final) y DCPIP (80 μ M final). Se inicia la reacción con el agregado de 20 μ L de una dilución 1/20 de la muestra (fracción microsomal) y se sigue la disminución de la absorbancia a 600 nm durante 1 minuto. Se calcula la actividad específica de la enzima y la inducción se expresa como el cociente de éstas entre las ratas tratadas y el control negativo. Todas las medidas se realizan por triplicado.

DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD GLUTATIÓN S-TRANSFERASA.

En el ensayo de actividad GST se siguió la técnica de Jiang y colaboradores con pequeñas modificaciones.¹² Se utilizan como sustratos 1-cloro-2,4-dinitrobenceno (CDNB) y glutatión reducido (GSH). La reacción se sigue durante 1 minuto por aumento en la absorbancia a 340 nm ($\epsilon=9.6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$, longitud de onda a la que absorbe el conjugado CDBN-GSH. Se prepara una solución stock de CDBN 200 mM en etanol 95 % v/v.

La mezcla de reacción contiene amortiguador fosfato (100 mM, pH 6.5), CDBN (1 mM final) y glutatión reducido (1 mM final). Se inicia la reacción con el agregado de 20 μ L de una dilución 1/20 de la muestra (fracción microsomal). Se calcula la actividad específica de la enzima y la inducción se expresa como el cociente de éstas entre las ratas tratadas y el control negativo. Todas las medidas se efectúan por triplicado y se realiza una corrección por actividad espontánea en ausencia de enzima.

DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD EROD MEDIADA POR CYP.

La actividad citocromo P450 se cuantificó mediante el ensayo de actividad EROD (O-dealquilación de 7-etoxiresorufina) según la técnica de Burke y colaboradores.¹²² A la mezcla de reacción conteniendo amortiguador fosfato de potasio (0.1 M, pH 7.6), 7-etoxiresorufina (5 μ M final) y entre 10 y 20 μ g de muestra se agregó NADPH (250 μ M final) para comenzar la reacción. La cantidad de resorufina formada se calculó mediante fluorometría ($\lambda_{\text{emisión}} = 585 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{excitación}} = 571 \text{ nm}$). La cinética se siguió durante 5 min a 37 °C y la actividad específica se expresó como unidades relativas de fluorescencia por minuto por mg de proteína (URF $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$). Las medidas se hicieron por triplicado. La inducción fue expresada como la tasa de actividad específica entre los grupos tratados y el grupo control. Se preparó una solución stock de 7-etoxiresorufina 0.1 mg/mL en DMSO y se determinó su concentración exacta por espectrofotometría a 464 nm ($\epsilon= 23000 \text{ M}^{-1} \text{cm}^{-1}$).

CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS.

Para la concentración de proteínas se utilizaron los métodos de Bradford y BCA, principalmente Bradford para muestras provenientes del *in vivo* y BCA para muestras provenientes de los ensayos *in vitro*.

Método de Bradford¹²³ Se partió de BSA 0.1 mg/mL, cuya concentración se determinó por espectrofotometría UV-Vis a 279nm, $\epsilon=0.667(\text{g/L})^{-1}\text{cm}^{-1}$. Se realizó una curva de calibración ($\text{Abs}_{595\text{nm}}$ vs [BSA]) preparando un set

¹²² Burke, M. D.; Thompson, S.; Elcombe, C. R.; Halpert, J.; Haaparanta, T.; Mayer, R. T. Ethoxy-, pentoxy- and benzyloxyphenoxazones and homologues: a series of substrates to distinguish between different induced cytochromes P-450. *Biochem. Pharmacol.* 1985, 34(18): 3337-3345.

¹²³ Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Annal. Biochem.* 1976, 72: 248-254.

de estándares de 0, 10, 20, 40 y 60 µg/mL de BSA. Las muestras problema se incubaron durante 5 min con el reactivo de Bradford, y se midió la absorbancia relativa al blanco a 595 nm.

Método del BCA¹²⁴ Se utilizó el método del ácido bicinconínico (BCA) utilizando el *kit* comercial de Sigma según especificaciones del proveedor en formato de placa de 96 pocillos. A 25 µL de muestra proteica se le adicionaron 200 µL del reactivo de trabajo BCA (reactivo A/reactivo B 1:50). El reactivo A contiene BSA, Na₂CO₃/NaHCO₃, tartraro de sodio en NaOH, pH 11.3 y el reactivo B contiene CuSO₄.5H₂O 4% (p/v). Se incubó la placa a 37 °C durante 30 min y se midió la absorbancia a 562 nm en el lector de placas. La concentración de la muestra proteica se mantuvo entre 0.2 y 1.0 mg/mL. Se realizó una curva de calibración con BSA para cada ensayo utilizando un set de estándares de 0, 0.2, 0.4, 0.6 0.8 y 1 mg/mL de BSA.

INMUNOCITOQUIMICA^{125,126}

La inmunocitoquímica de las células Hepa1c1c7 fueron fijadas con *p*-formaldehído al 4% p/v y permeabilizadas con Triton X-100 0.1 % v/v durante 15 min. La solución de bloqueo contenía, PBS-BSA 0.1 %, p/v, suero de caballo 2% y Triton X-100 0.1 % v/v en PBS. Se incubó toda la noche con el anticuerpo primario policlonal de conejo anti Nrf2 de ratón (Santa Cruz, Biotechnology, sc-722). Se incubó con el anticuerpo secundario anti-conejo Alexa 488 diluido 1/1000 en PBS-Triton X-100 0.1 % v/v durante 1h a temperatura ambiente. Los núcleos se tiñeron con Hoechst 5 µg/mL. La inmunofluorescencia fue observada en microscopio de epifluorescencia IX81 Olympus.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Los datos se describen como la media ± el desvío estándar (DE) de al menos dos o tres experimentos independientes, a no ser que se especifique otra forma. Cada condición fue realizada por duplicado ó triplicado en cada ensayo, con la excepción de aquellos casos donde se especifiquen otras condiciones.

Para la comparación entre grupos se utilizó el test *t* para muestras pareadas y se consideró un valor *p*<0.05 para determinar diferencias estadísticamente significativas.

¹²⁴ Bicinchoninic Acid Protein Assay Kit, *Technical Bulletin*, Sigma, Saint Louis, USA.

¹²⁵ Nrf2 (C-20): sc-722, *Data sheet*, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, USA.

¹²⁶ Arredondo, F.; Echeverry, C.; Abin-Carriquiry, J.A.; Blasina, F.; Jones, D.P.; Go, Y.M.; Liang, Y.L.; Dajas, F. After cellular internalization, quercetin causes Nrf2 nuclear translocation, increases glutathione levels and prevents neuronal death against an oxidative insult. *Free Rad. Biol. Med.* 2010, 49(5):738-747.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

1. Fue posible sintetizar nuevos análogos de flavonoides, específicamente chalconas, con moderados a excelentes rendimientos. Se obtuvieron mediante procedimientos simples, de bajo costo, amigables con el medio ambiente y de alta eficiencia atómica (series I y II) y fue posible incursionar con muy buenos resultados en técnicas de síntesis no convencionales como síntesis en fase sólida (serie III).
2. Se optimizó un modelo celular (anexo), que permitió realizar un *screening* de forma rápida y eficiente de moduladores de enzimas detoxificantes de xenobióticos, que es capaz además de distinguir entre inductores mono y bifuncionales sin necesidad de cuantificar simultáneamente enzimas de fase I y II. Gracias a la utilización de este modelo fue posible realizar un tamizaje primario de todos los compuestos obtenidos sintéticamente y de los seleccionados de nuestra quimioteca.
3. A partir de la búsqueda en una biblioteca propia de compuestos se identificaron estructuras farmacofóricas no descritas en la literatura como inductoras monofuncionales de enzimas de fase II, en particular los quimiotipos: furoxano, *N*-óxido de 1,2,4-triazina y 1,4-dihidropirimidin-2-ona, siendo los mejores derivados 4-fenilfuroxano-3-carbaldehído (**Q2**), *N*⁴-óxido de 4-feniletetil-5-metil-1,2,4-triazina (**Q16**) y 6-metil-4-(3-nitrofenil)-2-tioxo-1,2,3,4-tetrahidropirimidina-5-carboxilato de etilo (**Q24**), respectivamente.
4. Se identificaron *in vitro* cinco nuevos compuestos con excelente comportamiento de inducción de enzimas detoxificantes de fase II, a saber (*E*)-1-(2-hidroxifenil)-3-(naftalen-1-il)-2-propenona (**SI-1**), (*E*)-1-(2-hidroxifenil)-3-(naftalen-2-il)-2-propenona (**SI-2**), (*E*)-3-(2-bromopiridin-3-il)-1-(2-hidroxifenil)-2-propenona (**SII-1**), (*E*)-3-(4-fenilfuroxan-3-il)-1-(2-hidroxifenil)-2-propenona (**SIII-2**) y (*E*)-1-fenil-3-(4-fenilfuroxan-3-il)-2-propenona (**SIII-5**). Los valores de índice de quimioprevención, determinados a través de los parámetros CD e IC₅₀, resultaron comparables e incluso mejores a agentes quimiopreventivos previamente descritos (FV4Br, *t*-BHQ, isoliquiritigenina y sulforafano).
5. Mediante estudios preliminares de inmunocitoquímica se observó que estos derivados son capaces de producir la translocación de Nrf-2 al núcleo y así, posiblemente, actuar por activación de la vía Nrf-2/ARE.
6. Estudios de citotoxicidad frente a líneas celulares tumorales, de estos compuestos potenciales agentes quimiopreventivos para el cáncer, demostraron que además exhiben actividad antitumoral *per se* con potencial selectividad histológica. Mayores estudios son necesarios en este campo.

7. Uno de los resultados más auspicios de este trabajo es la baja genotoxicidad que presentaron en su conjunto todas las chalconas evaluadas, demostrada a través de Test de Ames y del ensayo del cometa. Existe una tendencia mundial en la I + D de fármacos de incluir este tipo de ensayos en etapas cada vez más tempranas de forma de no malgastar esfuerzos en el desarrollo de moléculas bioactivas que resultan finalmente dañinas para el organismo.
8. Cabe resaltar que este trabajo permitió confirmar la efectividad *in vivo* de los compuestos que resultaron líderes en los ensayos *in vitro*. Principalmente deben ser destacados los compuestos **SII-1**, **SIII-2** y **SIII-5**, con un muy comportamiento en la modulación de enzimas de fase II en los tres tejidos estudiados (hígado, colon y mama).
9. Finalmente, debemos considerar que el desarrollo de los derivados **SIII-2** y **SIII-5**, los cuales son moléculas híbridas flavonoide-furoxano, aporta un aspecto novedoso al campo de la quimioprevención del cáncer.

ANEXO

OPTIMIZACIÓN DE UN MODELO DE SCREENING QUE PERMITA EVALUAR LA CAPACIDAD MODULADORA DE ENZIMAS DETOXIFICANTES DE XENOBIÓTICOS

Generalidades y contexto histórico

Como se discutiera previamente en el capítulo de antecedentes y justificación, nuestro grupo de trabajo ha desarrollado especialmente en el marco de mi trabajo final de grado de la Lic. en Bioquímica un método *in vivo* para determinar la capacidad moduladora de enzimas detoxificantes de xenobioticos.¹²⁷ De esta forma, se pueden identificar inductores monofuncionales de enzimas de fase II con potencial actividad quimiopreventiva para el cáncer. Este método, desarrollado en ratas, consiste en la administración diaria por vía oral mediante el uso de una sonda intragástrica los compuestos a evaluar durante dos o tres semanas. Transcurrido este tiempo, los animales son sacrificados, se extrae el hígado y se realiza un fraccionamiento subcelular de forma de obtener las fracciones citosólica y microsomal aisladas. Como enzimas biomarcadoras de la sobreexpresión de enzimas de fase II se utilizan, Glutatión-S-transferasa (GST, EC: 2.5.1.18) y NADP(H):quinonaoxidoreductasa (QR, EC: 1.6.5.2, antiguamente EC:1.6.99.2), las cuales son cuantificadas en la fracción citosólica soluble. Se determina también en la fracción microsomal actividad EROD como biomarcador de enzimas de fase I, principalmente CYP1A1. Este método posee la ventaja de reflejar la realidad biológica de manera fidedigna, por ser un método *in vivo*, pero es poco eficiente a la hora de utilizarlo como método de tamizaje. En este sentido muestra también otra desventaja, ya que requiere mayor cantidad de compuesto a ensayar, pudiendo ser esto un inconveniente y limitación desde el punto de vista sintético.

Elección de la línea celular, el formato y el biomarcador

En este contexto es que se plantea en esta tesis el desarrollo y puesta a punto de un método de tamizaje más eficiente que permita identificar inductores monofuncionales de enzimas de fase II. Se decide utilizar un método *in vitro* a nivel celular, escogiéndose la línea celular MCF-7 (derivada de adenocarcinoma de mama) para la optimización del ensayo. Esta línea se encontraba disponible en nuestro laboratorio y es usada junto con un panel de tres líneas celulares tumorales humanas para determinar actividad citotóxica antitumoral, como se discutirá más adelante en este capítulo.

Se utiliza un formato en placa de 24 pocillos dado que nos permite obtener un volumen de fracción citosólica, aproximadamente 500 µL, suficiente para determinar otras actividades enzimáticas si fuese necesario e incluso cuantificar proteínas en la misma muestra. Nos permite además congelar la fracción citosólica hasta su análisis posterior. Este nuevo formato, incluye mejoras importantes respecto al método ampliamente distribuido, desarrollado por Prochaska y Santamaría¹²⁸ en formato de placa de 96 pocillos, dado que este último solo permite cuantificar QR con la muestra obtenida en un solo ensayo y no se puede conservar la muestra para análisis posteriores. Se optó entonces por tratar las células con los compuestos a ensayar durante 48 h, tiempo

¹²⁷ Cabrera, M. Evaluación de la modulación de enzimas detoxificantes de xenobióticos por análogos sintéticos de flavonoides naturales: potenciales agentes quimiopreventivos para el cáncer. *Trabajo Especial II, Lic. en Bioquímica, Facultad de Ciencias, UdelAR*, 2006.

¹²⁸ Prochaska, H.J.; Santamaría, A. Direct measurement of NAD(H):quinone reductase from cells cultured in microtiter wells: a screening assay for anticarcinogenic enzyme inducers. *Anal. Biochem.* 1988. 169, 328-336.

que se considera adecuado para que el compuesto en cuestión se internalice y desencadene, en caso de ser activo, el proceso molecular que llevará a la síntesis *de novo* de enzima.

La purificación de la fracción citosólica a la cual se le cuantifica la actividad de fase II correspondiente se realizó mediante sonicación y centrifugación diferencial, adaptando un método previamente descrito.¹²⁹ A la hora de elegir el biomarcador (enzima de fase II) con el cual realizar el tamizaje se pensó inicialmente en GST, dada la facilidad y mayor economía del método de cuantificación enzimática respecto a QR (ver materiales y métodos). En todos los ensayos de optimización y de rutina se utilizan dos controles positivos, un inductor monofuncional, *t*-BHQ y un inductor bifuncional, FV4Br (posee además mayor semejanza estructural con los flavonoides y análogos desarrollados en esta tesis). Su efectividad está ampliamente descrita tanto en ensayos *in vitro* como *in vivo*.

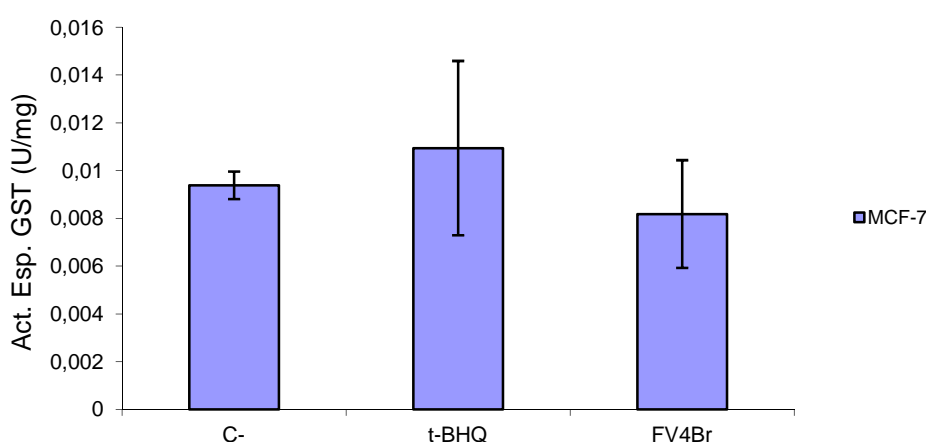


Figura 4.1. Inducción de GST en células MCF-7 tratadas con *t*-BHQ (20 μ M) y FV4Br (25 μ M) durante 48h. La actividad se expresa como actividad específica (U/mg). C- (control negativo, células sin tratar)

Con estas consideraciones se procedió a la realización del ensayo en placa de 24 pocillos, administrando los compuestos durante 48 h, purificando la fracción citosólica mediante sonicación y centrifugación diferencial y cuantificando actividad GST como enzima de fase II. En la grafica 4.1 se muestran los resultados para *t*-BHQ y FV4Br, no observándose para ninguno de los dos una sobreexpresión significativa de GST. En el caso de *t*-BHQ, se obtiene una actividad levemente aumentada respecto a las células sin tratar (control negativo), corroborando lo observado en un trabajo anterior dónde se consigue una inducción de 4,6 % de GST sobre células MCF-7 tratadas con *t*-BHQ 100 μ M.¹³⁰ No fue posible comparar con otras descripciones el resultado obtenido para FV4Br en células MCF-7 en condiciones similares. Analizando la grafica 4.1 se aprecia incluso una pequeña

¹²⁹ Houghton, P.; Fang, R.; Techatanawat, I.; Steventon, G.; Hyland, P.J.; Lee, C.C. The sulphorodamine (SRB) assay and other approaches to testing plant extracts and derived compounds for activities relates to reputed anticancer activity. *Methods*, 2007, 42: 377-387.

¹³⁰ Jiang, Z.; Chen, C.; Yang, B.; Hebbar, V.; Kong, A. Differential responses from seven mammalian cell lines to the treatments of detoxifying enzyme inducers. *Life Science*. 2003, 72: 2243-2253.

inhibición de la actividad GST que carece de explicación. Se describió sin embargo que cuando las células MCF-7 son tratadas en condiciones similares con otro flavonoide también considerado bifuncional, β NF, se produce una inhibición de GST significativa ($p < 0,01$) del 17 % respecto al control negativo.¹³⁰ Por otro lado existen observaciones de que el tratamiento de células MCF-7 con FV4Br 0,01 μ M produce una reducción de la unión covalente de BaP triteado metabólicamente activado al ADN celular.¹³¹ Se ha documentado ampliamente que esta acción desactivante y detoxificante del BaP es llevada a cabo por diferentes isoformas de GSTs. Dado estos resultados el análisis de la sobreexpresión de GST mediada por inductores mono y bifuncionales no parece ser adecuado como método de *screening* de inductores de enzimas de fase II.

Se procede entonces a sustituir GST por QR, manteniendo el resto del modelo incambiado. Cuando se analizan los resultados obtenidos para *t*BHQ, presentados en la figura 4.2, se puede observar que a la concentración ensayada, 20 μ M, se produce un aumento significativo del 40 % de la actividad QR respecto a las células sin tratar. En la bibliografía se describe una inducción de 25,4 % de QR cuando las células MCF-7 son sometidas a *t*BHQ 100 μ M. Esta menor inducción descrita puede deberse a que, dado que la dosis evaluada por el grupo de Jiang y colaboradores es cinco veces superior, podría estar provocando un efecto tóxico sobre las células resultando en una disminución de la actividad QR neta.¹³⁰ Cuando analizamos la inducción de QR provocada por FV4Br (figura 4.2), observamos una inducción del 90 %, no encontrándose trabajos anteriores sobre modulación de actividad QR por FV4Br en células MCF-7.

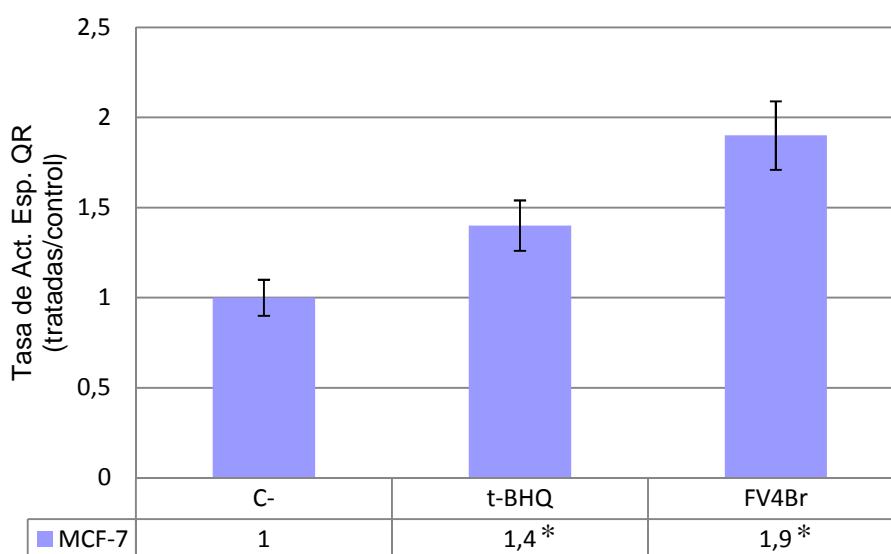


Figura 4.2. Inducción de QR en células MCF-7 tratadas con *t*-BHQ (20 μ M) y FV4Br (25 μ M) durante 48h. La inducción se expresa como tasa de actividad específica QR (células tratadas/control). C- (control negativo, células sin tratar). * denota diferencia significativa, $p < 0,05$.

¹³¹ Song, L. L.; Kosmeder II, J. W.; Kook Lee, S.; Gerhäuser, C.; Lantvit, D.; Moon, R. C.; Moriarty, R. M.; Pezzuto, J. M. Cancer chemopreventive activity mediated by 4'-bromoflavone, a potent inducer of phase II detoxification enzymes. *Cancer Res.* 1999, 59: 573-585.

El modelo celular y el nuevo formato desarrollado resultan adecuados para ser utilizados como método de *screening* rápido y reproducible. Cuando las muestras son analizadas, congeladas y nuevamente re-analizadas se obtienen resultados reproducibles (datos no mostrados). En cuanto al biomarcador utilizado se demostró que es más efectiva la cuantificación de QR, en comparación con la GST empleada previamente. Como ya se comentó, la línea MCF-7 no parece ser representativa del comportamiento de los inductores *in vivo* y en otros modelos descritos. Se decide entonces mantener la actividad QR como biomarcador primario de inducción de enzimas de fase II, ensayando otras líneas celulares.

Discriminación entre inductores mono y bifuncionales

De Long y colaboradores fueron los primeros en sugerir explorar la actividad específica de QR en células de hepatoma murino Hepa1c1c7.¹³² Estas células mimetizan el tejido animal respondiendo a una amplia variedad de agentes quimiopreventivos.¹³³ Las células Hepa1c1c7 fueron originalmente establecidas a partir de hepatoma de ratones C57L/J y el clon denominando 1c1c7 fue seleccionado por su actividad hidroxilasa de hidrocarburos aromáticos altamente inducible. Esto hizo que la línea fuera importante en el análisis de las características funcionales del receptor de hidrocarburos aromáticos (Ahr).¹³⁴ Seleccionamos esta línea, además porque posee muchas características de tejidos normales, en particular la capacidad de activación de procarcinógenos y el metabolismo de xenobióticos, el cual se encuentra en general bien representado. Tiene también la ventaja de que existen comercialmente mutantes defectivos en la vía Ahr-XRE.¹³⁵ Posee varias actividades mediadas por CYP altamente inducibles, como lo es la actividad EROD, mediada principalmente por CYP1A1, 1A2, 1B1, cuya inducción se asocia con la activación de procarcinógenos. Por último, esta línea celular posee requerimientos nutricionales y hormonales normales.¹³⁶

El mutante generado a partir de la línea Hepa1c1c7 salvaje o *wild type* denominado BpRc1 se encuentra disponible comercialmente y tiene la particularidad de poseer la vía Ahr-XRE no funcional. Esto se debe a que no es capaz de translocar el complejo Ahr-ligando al núcleo. Haciendo uso de esta característica podemos evaluar la capacidad inductora de enzimas de fase II (en este caso QR), en ambas líneas. Realizando ensayos paralelos en las mismas condiciones e incluso utilizando la misma solución *stock* del compuesto a evaluar de forma de minimizar la cantidad de variables se puede determinar si el agente es un inductor mono o bifuncional. Aquellos

¹³² De Long, M. J.; Prochaska, H. J.; Talalay, P. Induction of NAD(P)H:quinone reductase in murine hepatoma cells by phenolic antioxidants, azo dyes, and other chemoprotectors: a model system for the study of anticarcinogens. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1986, 83 (3): 787-791.

¹³³ Dinkova-Kostova, A.T.; Fahey, J.W.; Talalay P. Chemical structures of inducers of nicotinamide quinone oxidoreductase 1 (NQO1). *Methods Enzymol.* 2004, 382: 423-448.

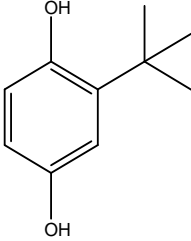
¹³⁴ Bernhard, H.D.; Darlington, G.J.; Ruddle, F.H. Expression of liver phenotypes in cultured mouse hepatoma cells: synthesis and secretion of serum albumin. *Dev. Biol.* 1973, 35:86-89.

¹³⁵ Miller, A.G.; Israel, D.; Whitlock, J. P. Biochemical and genetic analysis of variant mouse hepatoma cells defective in the induction of benzo(a)pyrene-metabolizing enzyme activity. 1983. *J. Biol. Chem.* 258(6):3523-3527.

¹³⁶ Fahey, J. W.; Dinkova-Kostova, A. T.; Stephenson, K. K.; Talalay, P. The "Prochaska" microtiter plate bioassay for inducers of NQO1. *Methods Enzymol.* 2004, 382: 243-258.

compuestos que induzcan en niveles similares la actividad QR en la línea *wild type* y en la línea mutante BpRc1 serán considerados como inductores monofuncionales, ya que el mecanismo por el cual estarían provocando la inducción sería mediante la vía del ARE, dado la no funcionalidad de la vía Ahr-XRE.

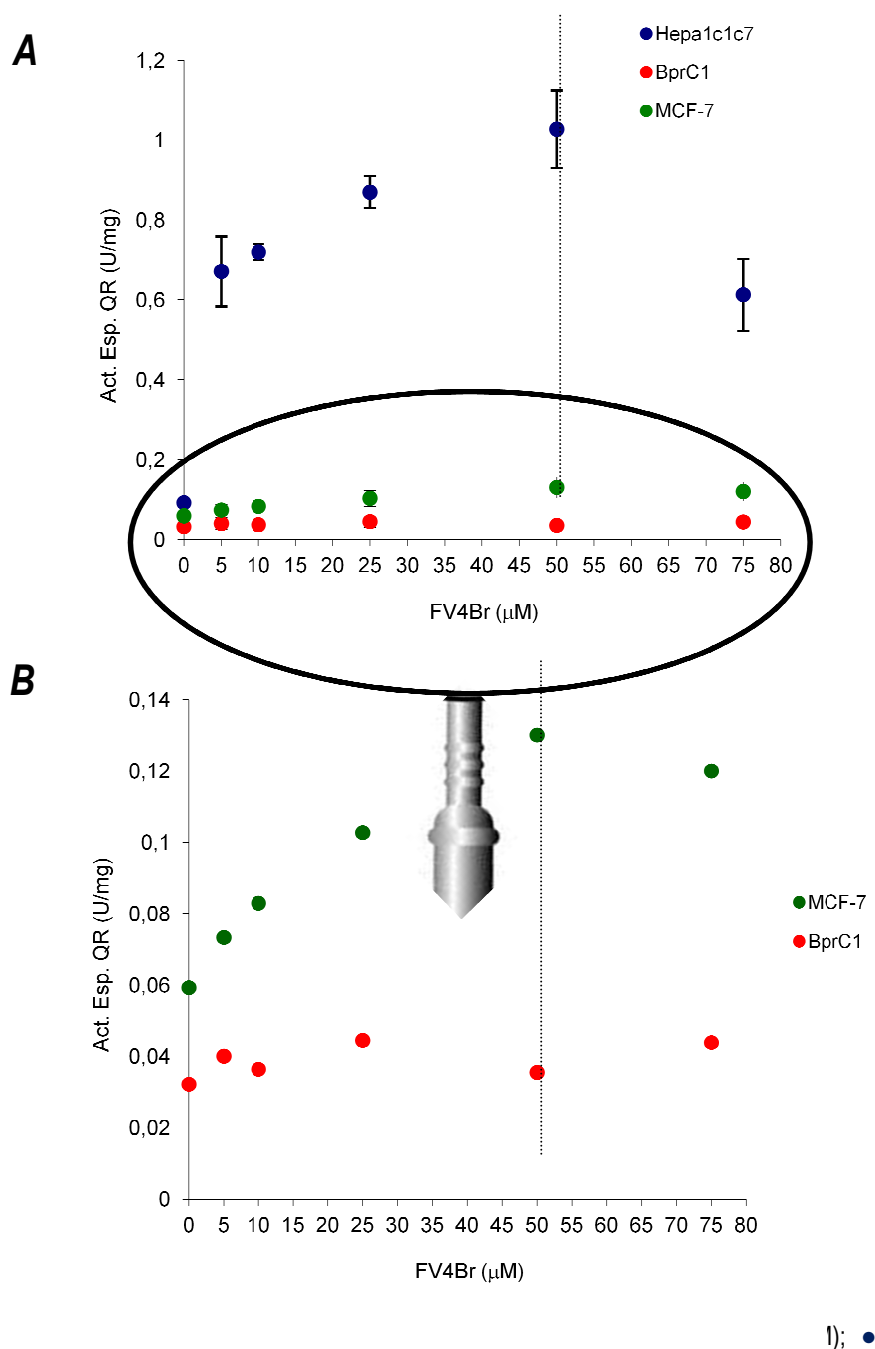
Tabla 4.1. Inducción de QR por *t*-BHQ después de 48h, determinación de CD.

		
Ref.	Línea Celular	CD (μM)*
<i>t</i> -BHQ	Hepa1c1c7	12,3 \pm 1,4
	BpRc1	10,1 \pm 1,2
	MCF-7	43,6 \pm 2,8

*CD: Concentración necesaria para duplicar la actividad QR (μM). Los datos son expresados como media de tres experimentos independientes \pm su desviación estándar.

Cuando analizamos la inducción de QR por FV4Br en las líneas Hepa1c1c7 y en su mutante BpRc1 a 25 μM (misma dosis ensayada en MCF-7) observamos que provoca un aumento en la actividad QR de aproximadamente 10 veces en la línea *wild type* y que no produce cambios significativos con respecto a las células no tratadas en la línea mutante BpRc1 (ver grafica 4.2). Estos resultados concuerdan con los datos descritos para esta flavona, que es un agente bifuncional y posee un CD (concentración necesaria para duplicar la actividad QR) entre 0,01 y 0,02 μM según la bibliografía consultada.^{131,137}

¹³⁷ Cuendet, M.; Oteham, C.P.; Moon, R.C.; Pezzuto, J.M. Quinone reductase induction as a biomarker for cancer chemoprevention. *J. Nat. Prod.* 2006, 69(3):460-463.



Cuando se analizan los resultados presentados en la tabla 4.1 de inducción de QR por *t*-BHQ también concuerdan con los descritos previamente en la bibliografía, con un CD en Hepa1c1c7 del orden de 10 μM .¹³⁸ Cabe destacar en este caso que los valores de CD obtenidos en Hepa1c1c7 y en BprC1 para QR son del mismo orden y muy similares entre sí (ver tabla 4.1), por lo que se verifica que la *t*-BHQ es un inductor monofuncional.

¹³⁸ Prochaska, H. J.; De Long, M. J.; Talalay, P. On the mechanisms of induction of cancer-protective enzymes: a unifying proposal. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1985 82: 8232-8236.

Con los resultados obtenidos con *t*-BHQ y FV4Br podemos concluir que se ha logrado optimizar un modelo de *screening* como se había propuesto. En resumen, se trata de un modelo celular en formato de placa de 24 pocillos que se realiza con dos líneas celulares (Hepa1c1c7 y en BpRc1) en ensayos paralelos, y nos permite discriminar entre inductores mono y bifuncionales. Las células son tratadas con el compuesto deseado durante 48h para luego cuantificar actividad QR como biomarcador en la fracción citosólica purificada mediante sonicación y centrifugación diferencial.

Para completar la puesta a punta del ensayo nos resta seleccionar la dosis a usar para evaluar los nuevos compuestos. Dado que los compuestos a ensayar en esta tesis son flavonoides y análogos se decide realizar una curva dosis respuesta utilizando FV4Br., ya que posee mayor semejanza estructural con los compuestos que queremos testear que la *t*-BHQ, por ser un flavonoide sintético. En la figura 4.3 podemos ver como FV4Br produce una inducción QR creciente desde 0 hasta 50 μ M donde alcanza su valor máximo y luego a dosis mayores comienza a decaer porque el compuesto comienza a ser tóxico para las células Hepa1c1c7 (IC_{50} =85 μ M). Si analizamos la inducción QR versus la dosis en MCF-7 se puede apreciar que sigue la misma tendencia, sin embargo la inducción es menor en todas las dosis, como se discutió anteriormente (ver figura 4.3B). Se confirma además que FV4Br no es capaz de inducir QR a ninguna dosis de las ensayadas (0-75 μ M) en la línea mutante BpRc1, reafirmando así su carácter de agente bifuncional (figura 4.3B)

A pesar de lograrse la máxima inducción de QR con alrededor de 50 μ M de FV4Br, se decide realizar el *screening* con los nuevos compuestos a una concentración de 10 μ M por dos motivos. Primero, porque buscamos que los nuevos compuestos exhiban actividad inductora a bajas dosis y segundo porque una posible citotoxicidad causada por dosis elevadas podría enmascarar un resultado positivo. Además, aquellos compuestos que presenten un buen perfil de inducción en ambas líneas celulares (Hepa1c1c7 y BpRc1) se estudiará su comportamiento dosis-respuesta para obtener el CD. De esta forma se evaluará la toxicidad de aquellos compuestos que resulten prometedores en el *screening* primario en ambas líneas celulares, determinando su IC_{50} . También se calculará un índice de quimioprevención, denominado comúnmente en la bibliografía como CI, que resulta del cociente IC_{50}/CD . Un agente quimiopreventivo será mejor cuanto mayor sea su CI, en otras palabras cuando sea poco tóxico y capaz de duplicar la actividad QR a la menor concentración posible.

Correlación *in vitro*/ *in vivo*

Se estudió también si el modelo *in vitro* optimizado para medir la inducción de enzimas de fase II, se correlacionaba con los resultados *in vivo* previamente obtenidos por nuestro grupo para algunos flavonoides de síntesis, estructuralmente similares a los que se evalúan aquí. En la figura 4.4 se puede observar como existe una clara correlación *in vivo/in vitro* en la inducción de QR por los compuestos A, B y C. Para las dosis ensayadas en estos experimentos (15mg/Kg p.v./día *in vivo* y 40 μ M *in vitro*) la inducción de QR es mayor *in vitro* para los tres compuestos. Estos resultados nos alientan a utilizar el modelo *in vitro* como método de tamizaje de compuestos activos. Los compuestos que resulten más interesantes y que se compruebe mediante

experimentos adicionales que son inductores de la vía Nrf2-ARE serán finalmente evaluados *in vivo* para confirmar su efectividad.

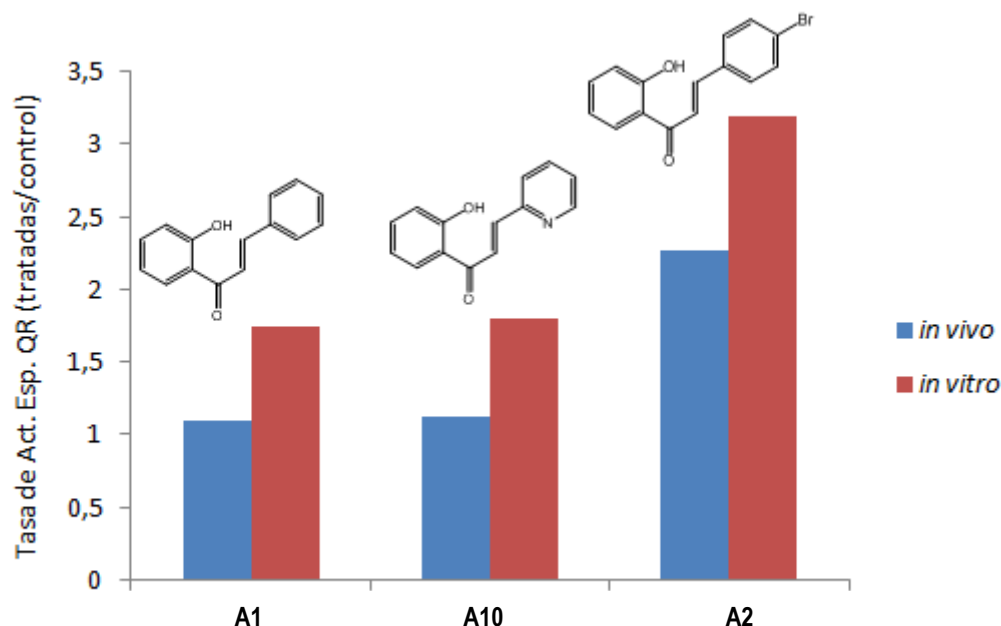


Figura 4.4. Correlación *in vivo* (azul)/ *in vitro* (rojo) de la capacidad inductora de tres flavonoides. La inducción se expresa como tasa de actividad específica QR (grupo tratado/grupo control) en ambos modelos. La inducción QR *in vivo* se determinó en hígado de ratas Wistar a las que se les administró por vía oral 15mg/Kg p.v./día del compuesto durante dos semanas. La inducción QR se determinó en células Hepa1c1c7 tratadas durante 48h a una dosis de 40 μ M.

Detección de *Mycoplasma* sp. en las líneas Hepa1c1c7 y BpRc1.

Una vez que el modelo fue optimizado para las células Heepa1c1c7 y BpRc1 se aseguró previo a su uso que las mismas no se encontraran contaminadas con *Mycoplasma* sp. Se sabe que alrededor de 15-35 % de las líneas celulares comúnmente utilizadas en los laboratorios se encuentra contaminada con *Mycoplasma* sp. La contaminación con *Mycoplasma* sp. causa una importante disrupción de las funciones celulares, como inhibición de la proliferación celular, de la biosíntesis de proteínas, alteraciones de las reacciones inmunológicas y alteraciones en la expresión génica.¹³⁹ Por estas razones es de vital importancia que las células a usar en el método de *screening* estén libres de *Mycoplasma* de forma que los resultados obtenidos sean confiables, por lo que se controló la ausencia de *Mycoplasma* en los cultivos celulares utilizando un método de detección por PCR.¹⁴⁰

¹³⁹ Schmitt, M.; Pawlita, M. High-throughput detection and multiplex identification of cell contaminations. *Nucleic Acids Res.* 2009, 37(18): e119 2-8.

¹⁴⁰ Uphoff, C.C.; Drexler, H.G. Detection of mycoplasma contaminations in cell cultures by PCR analysis. *Hum. Cell.* 1999. 12:229–236.

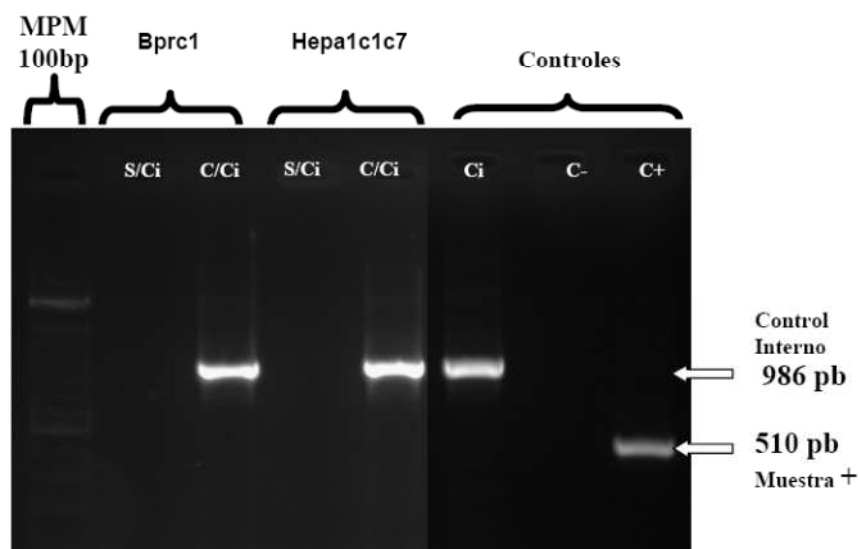


Figura 4.5. Detección de *Mycoplasma* mediante PCR. Se amplifica una región de 510 pb conservada.

De esta forma, todos los resultados presentados en esta tesis fueron realizados en cultivos no contaminados. A modo de ejemplo se puede observar en la figura 4.5, un ensayo en el que se observa la ausencia de *Mycoplasma* en las células Hepa1c1c7 y BpRc1.