

## Tesina de Grado

*Licenciatura en Bioquímica*

# Identificación de nuevas entidades farmacofóricas como moduladores de enzimas detoxificantes de xenobióticos. Potenciales agentes quimiopreventivos para el cáncer.

Stefani de Ovalle

Montevideo, diciembre 2012





*A mis padres  
y hermanos*

## Agradecimientos

Esta sección que podría una de las más sencillas, resulta ser una de las más complejas. Agradecer a quienes participan en el desarrollo de una tesina no es tarea sencilla. Son muchas las personas involucradas que colaboran apoyando e incentivando desde lo emocional hasta lo técnico y son todas y cada una de ellas muy importantes e indispensables para poder llevar a cabo los objetivos. Por esto quiero destacar que en esta sección de agradecimientos, el orden es arbitrario y que son todos de igual manera importantes y les estoy enteramente agradecida.

A Mauricio Cabrera por guiarme en este trabajo y apoyarme en el desarrollo del mismo incondicionalmente.

A Mercedes González y Hugo Cerecetto por brindarme la oportunidad de realizar mi tesina de grado en el laboratorio de Química Medicinal y por brindarme su apoyo durante el desarrollo de la misma.

A todos mis compañeros de laboratorio.

Al Laboratorio de Síntesis Orgánica Medicinal Universidad Federal de Río Grande del Sur por ceder gentilmente las THPs para realizar esta tesina.

A la Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII) por el financiamiento otorgado.

Al Instituto Pasteur por permitirme utilizar equipamientos indispensables para poder cumplir con mis objetivos.

A mis padres, hermanos y sobrinos por las fuerzas, el apoyo y por incentivarme a seguir adelante aun en momentos difíciles.

A Alex por los consejos, el apoyo y el amor.

A todas mis amigas; en especial a Ana, Cecilia, Elena, Estefanía y Jennyfer por estar siempre.

A todos, muchas gracias por formar parte de este sueño ya casi alcanzado.

---

**Índice**

|  |    |
|--|----|
| <b>Resumen</b>   | 7  |
| <b>Abreviaturas</b>  | 9  |
| <b>INTRODUCCIÓN</b>  | 10 |
| • CÁNCER   | 11 |
| • Generalidades sobre cáncer   | 11 |
| • Desarrollo de un tumor   | 13 |
| • QUIMIOPREVENCIÓN DEL CÁNCER  | 14 |
| • Definición   | 14 |
| • Enzimas de fase II y cáncer  | 15 |
| • ACTIVACIÓN DE GENES DE ENZIMAS DETOXIFICANTES  | 15 |
| • Vía del factor de transcripción Nrf2 ( <i>NF-E2 related factors</i> ) y el elemento de respuesta a antioxidantes (ARE) | 15 |
| • Regulación de Nrf2   | 16 |
| • El elemento de respuesta a antioxidantes (ARE) regulado por Nrf2   | 16 |
| • Vía receptor de hidrocarburos aromáticos (AhR) y el elemento de respuesta a xenobióticos (XRE).                        | 16 |
| • El elemento de respuesta a xenobióticos (XRE)  | 17 |
| • El complejo AhR-Arnt   | 17 |
| • TIPOS DE INDUCTORES DE ENZIMAS DETOXIFICANTES  | 18 |
| • Inductores bifuncionales y monofuncionales   | 18 |
| • Inductores de enzimas detoxificantes (naturales y sintéticos)  | 18 |
| <b>ANTECEDENTES</b>  | 20 |
| <b>OBJETIVOS</b>   | 23 |
| • Objetivo general   | 24 |
| • Objetivos específicos  | 24 |
| <b>PLAN DE TRABAJO</b>   | 25 |
| <b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>  | 27 |
| • Modelo celular   | 28 |
| • Inducción de QR por THPs y derivados   | 33 |
| • Curvas de dosis respuesta y citotoxicidad de THPs  | 31 |
| • Inducción de QR por NOTs   | 36 |
| • Curvas de dosis respuesta y citotoxicidad de NOTs  | 40 |

---

|   |           |
|---|-----------|
| • Inducción de GST por THPs   | 43        |
| • Inducción de GST por NOTs   | 44        |
| • Ensayos <i>in silico</i>  | 45        |
| • Determinación de la concentración que duplica la actividad enzimática (CD), concentración a la cual inhiben el 50% de las células (IC <sub>50</sub> ) e índice de quimioprevención (IQ) de THPs | 49        |
| • Determinación de la concentración que duplica la actividad enzimática (CD), concentración a la cual inhiben el 50% de las células (IC <sub>50</sub> ) e índice de quimioprevención (IQ) de NOTs | 51        |
| <b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>   | <b>53</b> |
| PARTE EXPERIMENTAL BIOLÓGICA  | 54        |
| • Crecimiento celular   | 54        |
| • Criopreservación  | 54        |
| • Recuento celular  | 54        |
| • Ensayo <i>in vitro</i> de actividad enzimática  | 55        |
| • Determinación de la actividad enzimática de QR  | 55        |
| • Determinación de la actividad enzimática de GST   | 56        |
| • Cuantificación de proteína  | 56        |
| • Ensayo de citotoxicidad   | 57        |
| • Determinación de IQ   | 57        |
| ESTUDIOS PREDICTIVOS DE PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS  | 58        |
| • Ensayo <i>in silico</i>   | 58        |
| <b>CONCLUSIONES Y PERSPECTIVA</b>   | <b>59</b> |
| <b>BIBLIOGRAFÍA</b>   | <b>62</b> |

Resumen

---

## Resumen

La quimioprevención del cáncer refiere al uso de sustancias naturales o sintéticas, denominadas agentes quimiopreventivos, para impedir, detener o revertir el proceso de carcinogénesis. Una estrategia de protección contra la carcinogénesis es la inducción de enzimas detoxificantes, particularmente enzimas detoxificantes de fase II como son glutatión-S-transferasa (GST) y Quinona Reductasa (QR). Las denominadas enzimas detoxificantes de fase I, como son la familia de citocromos P450 (CYP) activan compuestos procarcinógenos volviéndolos altamente reactivos y por ende capaces de provocar daño celular. Por esto, la estrategia de quimioprevención apunta a la inducción selectiva de enzimas detoxificantes de fase II sin alterar la expresión de enzimas de fase I. Se han descrito una gran variedad de compuestos naturales y sintéticos capaces de inducir, en mayor o menor grado, enzimas detoxificantes de fase II. En este trabajo se han evaluado 27 derivados de dos nuevos hits moleculares: Tetrahidropirimidinonas (THPs) y N<sup>4</sup>-óxido de 1,2,4-triazinas (NOTs) como posibles agentes quimiopreventivos. Se evaluó *in vitro* la capacidad de inducción de QR y GST por parte de los mismos y la citotoxicidad frente a las líneas celulares empleadas. Además se estudiaron propiedades fisicoquímicas *in silico* para evaluar si estos compuestos presentan características deseables como posibles fármacos y riesgo de toxicidad. De los 27 compuestos evaluados, 26 resultaron inductores de enzimas detoxificantes de xenobóticos en al menos una línea celular y el 41% del total mostraron ser inductores monofuncionales de enzimas de fase II. Los derivados **7** (THP) y **19** (NOT) fueron los más interesantes causando sobreexpresión, a 10  $\mu$ M, de entre 200-400 % resultando incluso mejores que el control positivo t-BHQ. Por todo lo anteriormente mencionado estas nuevas estructuras farmacofóricas merecen mayor estudio y prometen ser buenos agentes quimiopreventivos para el cáncer.

**Palabras claves:** Quimioprevención del cáncer, Nrf2, N<sup>4</sup>-óxido de 1,2,4-triazina, Tetrahidropirimidinonas

## Abreviaturas

|  |   |
|--|---|
| Act- Actividad   | ERO-Especies Reactivas del Oxígeno                                  |
| ADN- Ácido Desoxirribonucleico                                     | Fv4Br- 4'-Bromoflavona  |
| AhR- Receptor de hidrocarburos aromáticos                          | GSH- Glutación Reducido   |
| ARE- Elemento de respuesta a antioxidantes                         | GST- Glutación-S-transferasa  |
| ARN-Ácido Ribonucleico   | IC <sub>50</sub> - Concentración Inhibitoria del 50%                |
| Arnt- Proteína translocadora de Ah                                 | IQ- Índice de quimioprevención                                      |
| BCA- Ácido bicinconínico   | Keap1- del inglés Kelch-like ECH associated protein 1               |
| BSA- Seroalbúmina Bovina   | NOTs- N <sup>4</sup> -óxido de 1,2,4-triazina                       |
| BTB- del inglés "Brick-a-brack Tram track, Broad-complex"          | Nrf2- del inglés Nuclear NF-E2 related factors                      |
| CBP- del Inglés "CREB binding protein"                             | OMS- Organización Mundial de la Salud                               |
| CD- Concentración (µM) para duplicar la actividad enzimática de QR | PBS-Solución Buffer Fosfato   |
| CDNB- 1Cloro-2,4-dinitrobenceno                                    | QR- Quinona Reductasa   |
| CHLCC- Comisión Honoraria de Lucha Contra el Cáncer                | REDEPICAN- Red de Sistemas de Información y Epidemiología en Cáncer |
| CYP- Citocromo p450  | RNC- Registro Nacional de Cáncer                                    |
| DCPIP - 2,6-Diclorofenolindofenol                                  | SFB- Suero Fetal Bovino   |
| DMEM- Medio Duplecco's Modified Tagle                              | <i>t</i> -BHQ- <i>tert</i> -butilhidroquinona                       |
| DMSO- Dimetilsulfóxido   | TCA- Ácido tricloroacético  |
| DS- Desviación estándar  | THPs- Tetrahidropirimidinonas                                       |
| EDTA- Ácido etilendiaminotetracético                               | Tris- Tris(hidroximetil)aminometano                                 |
| EPV- Programa de Vigilancia Epidemiológica                         | Wt- del Inglés Wild Type  |
| ERN- Especies Reactivas del Nitrógeno                              | XRE- Elemento de respuesta a xenobióticos                           |

## Introducción

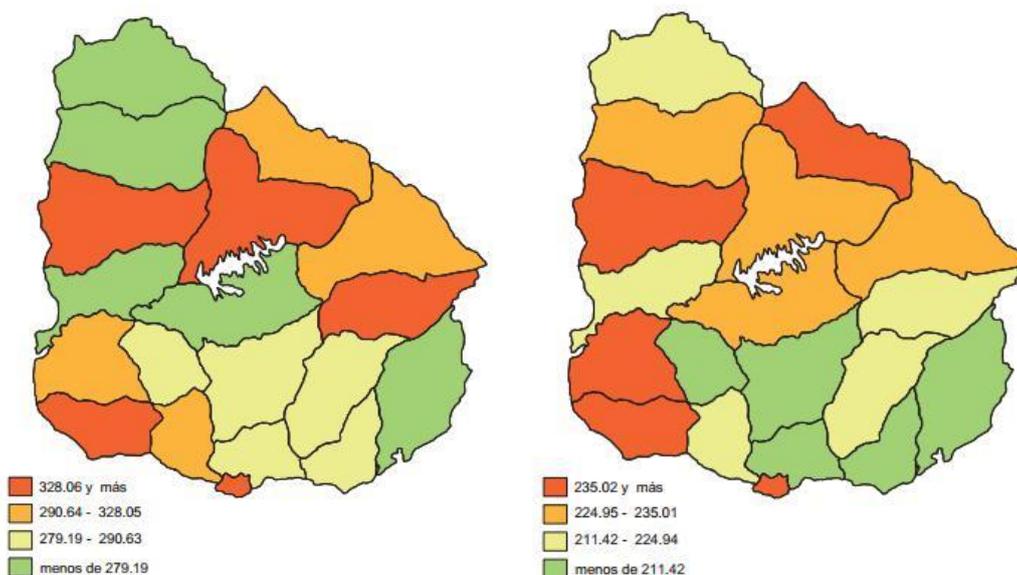
---

## CÁNCER

### *Generalidades sobre Cáncer*

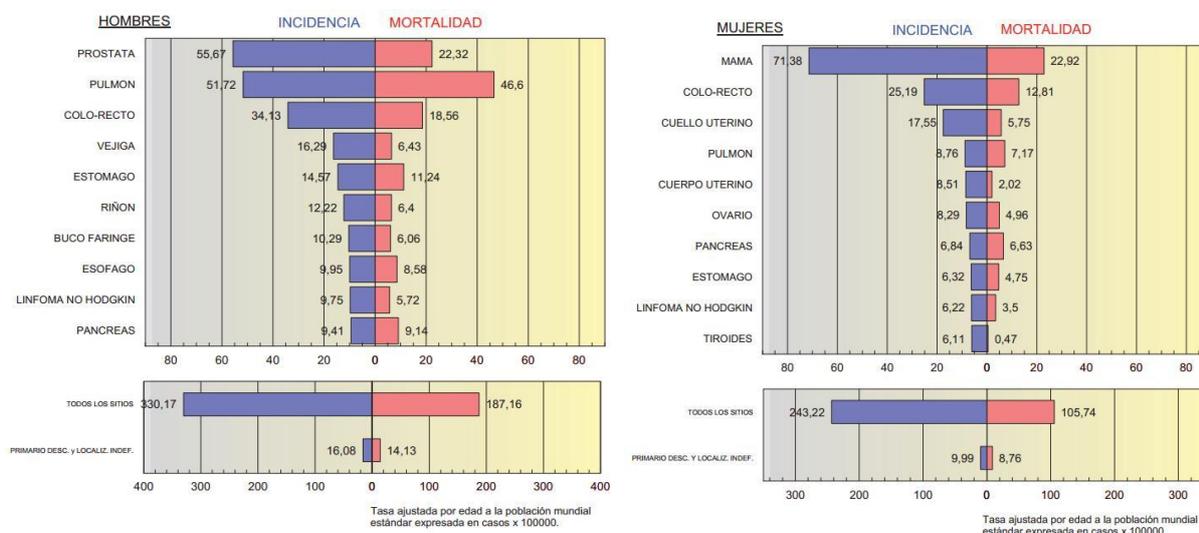
La Organización Mundial de la Salud (OMS) define cáncer, no como una enfermedad, sino como un amplio grupo de enfermedades capaces de afectar a cualquier parte del organismo, debido a la capacidad que poseen las células anormales de multiplicarse rápidamente, y en algunos casos, de expandirse más allá de sus límites habituales e invadir otros tejidos u órganos (lo que se conoce como metástasis). Ésta última es la principal causa de muerte debida a cáncer. Según lo descrito por la OMS, el cáncer es una de las principales causas de muerte en todo el mundo. Para el año 2008 se describieron 7,6 millones de defunciones debidas a cáncer. De los distintos tipos existentes, los que presentan mayores tasas de mortalidad son: cáncer de pulmón, estómago, hígado, colon y mama. El 30% de las muertes debidas a cáncer se atribuyen a factores de riesgo tales como la obesidad, ingesta reducida de vegetales, sedentarismo, al consumo de tabaco y alcohol. El consumo de tabaco se considera el factor de riesgo más importante y causa el 22% de las muertes mundiales de cáncer en general y el 71% de cáncer de pulmón. Los tipos de cáncer causados por virus son responsables del 22% de las muertes debida a esta causa, en países de bajos y medios ingresos. En 2008, el 70% de los cánceres se produjeron en países en los cuales los ingresos son medios y bajos. Se estima que las muertes por cáncer sigan aumentando en todo el mundo y alcancen la cifra de 13,1 millones para el año 2030.<sup>[1]</sup>

El Programa de Vigilancia Epidemiológica (PVE) del Registro Nacional de Cáncer (RNC) perteneciente a la Comisión Honoraria de Lucha Contra el Cáncer (CHLCC), forma parte de una Red de Sistemas de Información y Epidemiología en Cáncer (REDEPICAN) que reúne registros estadísticos de incidencia y mortalidad debidas a cáncer de España y Latinoamérica. Los resultados estadísticos demuestran que en Uruguay los tumores malignos constituyen la segunda causa de muerte después de las enfermedades cardiovasculares y se estima que más del 24% del total de las defunciones son debidas a cáncer.<sup>[2] [3]</sup>



**Figura 1.** Resultados de incidencia de cáncer en Uruguay para hombres (figura izquierda) y mujeres (figura derecha). Los resultados se expresan como tasa estandarizada por edad, población mundial estándar (casos x 100.000). Extraído de referencia 3

En la **Figura 1** se muestran los resultados estadísticos obtenidos en Uruguay, en el periodo 2002-2006, para hombres y mujeres en los distintos departamentos del país. Los resultados se expresan como Tasa Ajustada, siendo ésta la sumatoria de las Tasas Específicas (Casos de muerte observados/Población expuesta a riesgos) ponderadas por la población de sujetos que forman el grupo etario (población mundial). Puede observarse que pese a las diferencias en el resto de los departamentos, Colonia, Montevideo y Paysandú resultan ser de los más afectados tanto en hombres como en mujeres.



**Figura 2.** Resultados de incidencia y mortalidad debidas a cáncer, en hombres y mujeres para el periodo 2002-2006. Extraído de referencia 3

En la **Figura 2** se muestran los resultados de incidencia y mortalidad en Uruguay para el periodo 2002-2006. Puede observarse que en caso de los hombres, la mayor incidencia es debida a cáncer de próstata y en segundo lugar a cáncer de pulmón, mientras que la mayor mortalidad se debe a cáncer de pulmón más que de próstata. En mujeres, la mayor incidencia y mortalidad es debida a cáncer de mama y el cáncer de pulmón no representa tasas de incidencia y mortalidad significativas como es en el caso de los hombres.<sup>[4]</sup>

### **Desarrollo de un tumor**

El desarrollo de un tumor se debe al crecimiento celular anormal y la posterior proliferación. Si este no tiene la capacidad de invadir otros tejidos, se dice que es benigno. Se habla de cáncer cuando este tumor es maligno y adquiere la capacidad de diseminarse en el organismo invadiendo otros tejidos. Lo que ocurre es que las células que forman el tumor logran desprenderse, entrar al torrente sanguíneo y a los vasos linfáticos formando tumores en otros tejidos, proceso que se denomina metástasis.<sup>[5]</sup>

La formación de un tumor puede dividirse en tres fases: iniciación, promoción y progresión. La iniciación es el proceso por el cual el ADN sufre un daño crítico que permanece en las siguientes divisiones celulares o por un error en la reparación del mismo. La promoción se refiere a aquellos sucesos epigenéticos que contribuyen a la proliferación de las células iniciadas. Por último, la progresión es la aparición de cambios heredables más importantes que aparecen con las sucesivas divisiones celulares y da por resultado el desarrollo del tumor.<sup>[6]</sup>

En general el cáncer es causado por agentes químicos, físicos y biológicos, denominados carcinógenos, que dañan directamente al ADN o interfieren en su replicación o reparación. Los carcinógenos químicos son agentes naturales o sintetizados por el hombre, capaces de provocar daño directo en el ADN. Los agentes físicos causantes de tumores son la radiación electromagnética y de partículas con energía suficiente como para romper enlaces químicos. Por último, los agentes biológicos involucrados en el proceso de carcinogénesis, son ciertos virus capaces de inducir la formación de tumores malignos en sus huéspedes.<sup>[7]</sup>

## QUIMIOPREVENCIÓN DEL CÁNCER

### Definición

Cada vez son más las evidencias que afirman que la prevención del cáncer no solo se logra evadiendo la exposición a carcinógenos sino también mediante la ingesta de sustancias capaces de modular los mecanismos de defensa del organismo hospedero.<sup>[8]</sup> Así, el término quimioprevención, introducido por primera vez por M. Sporn a mediados de 1970, hace referencia al uso de sustancias químicas no tóxicas (naturales o sintéticas) para impedir, detener o revertir la carcinogénesis en etapas tempranas.<sup>[9]</sup>

Un agente quimiopreventivo efectivo debe cumplir ciertas características. En primer lugar debe intervenir en etapas tempranas del proceso de formación del tumor de manera de eliminar las células pre malignas antes de que se transformen en malignas. Además debe proteger a las células normales del proceso de transformación. El primer enfoque se refiere a la intervención a corto plazo sobre las lesiones pre malignas. La última estrategia requiere la exposición a un agente quimiopreventivo así como evitar la exposición a agentes causantes de cáncer y consumir una dieta balanceada. Mediante el consumo de fármacos o alimentos que posean características que los hacen beneficiosos para la salud, pueden modularse los niveles de enzimas metabolizadoras de xenobióticos que facilitan la eliminación de carcinógenos endógenos y ambientales.

Los agentes quimiopreventivos se dividen en dos categorías:

AGENTES BLOQUEANTES: son aquellos que impiden que el carcinógeno actúe sobre su sitio blanco, inhibiendo la activación metabólica del mismo o interaccionando con macromoléculas cruciales como el ADN, ARN y proteínas. Diversas clases de compuestos actúan como agentes bloqueantes. Entre estos hay agentes químicos que inhiben la activación metabólica de los carcinógenos o potencian su detoxificación, antioxidantes que atrapan radicales libres y otros que actúan sobre carcinógenos electrofílicos.

AGENTES SUPRESORES: interfieren en la promoción y progresión de la carcinogénesis a través de la proliferación, diferenciación y/o apoptosis celular. También actúan sobre las células iniciadas, inhibiendo su transformación hacia células malignas.

Un mecanismo por el cual los agentes bloqueantes son capaces de actuar como quimiopreventivos, es debida a su capacidad de modular la actividad de enzimas detoxificantes de fase II (como NAD(P)H Quinona Oxidoreductasa y Glutatión-S-transferasa) capaces de detoxificar y eliminar intermedios reactivos generados a partir de los carcinógenos. Existen evidencias de que muchas de estas enzimas citoprotectoras son reguladas a través del elemento de respuesta a antioxidantes (AREs), mediado por la activación del Factor de transcripción Nrf2 (NF-E2 related factors). La activación de la vía Nrf2-ARE es considerada una estrategia para la quimioprevención del cáncer.<sup>[10]</sup>

## **Enzimas de fase II y cáncer**

La mutagénesis, que inicia el proceso de carcinogénesis dañando el ADN, es mediada por especies electrofílicas, carcinógenos exógenos, procesos que llevan a la formación de un procarcinógeno en carcinógeno y por las especies reactivas del oxígeno (ERO). La inflamación crónica también se vincula al proceso de carcinogénesis por elevar los niveles de ERO y ERN (Especies Reactivas del Nitrógeno), citoquinas y factores de crecimiento que pueden provocar daño en el ADN, proliferación celular y la capacidad de éstas de volverse invasivas. Basado en esto, inhibir los procesos que dan lugar a la mutagénesis e inflamación crónica, potenciando la actividad de enzimas detoxificantes de especies electrofílicas así como incrementando la expresión de proteínas antioxidantes ha sido una estrategia interesante y efectiva de prevenir la carcinogénesis.

Muchos procarcinógenos experimentan transformaciones metabólicas convirtiéndose en especies altamente electrofílicas adquiriendo así la capacidad de dañar el ADN. Las enzimas detoxificantes de fase I (como son la familia de citocromos P450) a menudo metabolizan los procarcinógenos activándolos, mientras que las enzimas detoxificantes de fase II facilitan la eliminación del carcinógeno al hacerlo más soluble y por ende más fácilmente excretable. Ejemplos de estas últimas son Glutación-S.-transferasa (GST) y NAD(P)H Quinona óxidorreductasa (QR). Varios estudios realizados en ratones deficientes en estas enzimas y el estudio de los polimorfismos de las mismas en humanos apoyan la importancia de estas enzimas en potenciar la resistencia a la carcinogénesis.<sup>[11]</sup> Por lo tanto, una estrategia exitosa que apunta hacia la quimioprevención del cáncer es modular la expresión de enzimas detoxificantes de xenobióticos para lograr la eliminación de carcinógenos endógenos o ambientales.<sup>[12]</sup> Existen evidencias de que la carencia o baja expresión de enzimas detoxificantes de fase II (como QR) se correlaciona con una mayor susceptibilidad a desarrollar cáncer en humanos, lo que sustenta esta estrategia de quimioprevención.<sup>[13][14][15]</sup>

## **ACTIVACIÓN DE GENES DE ENZIMAS DETOXIFICANTES**

### **Vía Factor de transcripción Nrf2 (NF-E2 related factors) y el Elemento de Respuesta a Antioxidantes (ARE).**

#### Estructura del Nrf2

Nrf2 es un factor de transcripción de 66kDa. Pertenece a la subfamilia de factores de transcripción CNC (del inglés “*cap n collar*”) con dominio de unión al ADN de tipo cremallera de leucina en el extremo C-terminal, por el cual reconoce al elemento ARE en el promotor de sus genes diana.

En ratones y humanos, Nrf2 tiene seis dominios altamente conservados (Neh1-Neh6). El dominio Neh1 contiene la estructura en cremallera de leucina indispensable para la unión al ADN. El dominio N-terminal,

Neh2 es responsable de la regulación negativa de Nrf2 al interactuar con Keap1, tiene siete residuos de leucina los cuales son responsables de la degradación proteosómica de Nrf2. Neh3 es indispensable para la activación transcripcional ya que recluta un co-activador (CHD6). Los dominios Neh4 y Neh5, actúan de manera sinérgica para unir al co-activador CBP (*CREB-binding protein*) y activar la transcripción. La función de Neh6 se desconoce hasta el momento.<sup>[10][11][16]</sup>

### Regulación de Nrf2

En condiciones normales, Nrf2 se encuentra secuestrado en el citoplasma por la proteína Keap1 la cual se une a un complejo ubiquitina ligasa E3 (Cul3) que “marca “ a Nrf2 para su degradación en el proteosoma, de modo que en estas condiciones Nrf2 se mantiene en niveles bajos.

Keap1 se encuentra en forma de dímero en la célula y comprende cinco dominios de los cuales, el dominio N-terminal denominado BTB (*Bric-a-brac, Tramtrack, Broad-complex*) y el dominio central son responsables de la unión a Cul3, mientras que el dominio C-terminal es responsable de la unión a Nrf2 así como de la ubiquitinación y degradación del mismo. Los dominios restantes se encargan de la localización de Keap1 en el citoplasma. Uno de estos, el dominio de repetidos dobles de glicina (DGR) media la unión de la proteína al citoesqueleto de actina y el otro contiene una secuencia de exportación nuclear (NES).

### El elemento de respuesta a antioxidantes (ARE) regulado por Nrf2

ARE (del inglés *Antioxidant Response Element*) es un elemento en *cis* que se encuentra en los genes que codifican enzimas de fase II como son GST y QR, entre otras. Mediante el tratamiento de células con agentes quimiopreventivos se puede provocar la disociación de Nrf2 y su acumulación en el núcleo. Además, Nrf2 contiene una señal de localización nuclear que facilita su translocación desde el citoplasma al núcleo. Una vez allí, Nrf2 dimeriza con pequeñas proteínas de tipo MAF (proteínas con dominios en cremallera de leucina requeridos para la formación del heterodímero MAF-Nrf2) y se une al ARE interaccionando con la secuencia consenso 5'-TGANNNGC-3' de éste, promoviendo así la transcripción de los genes que contienen esta secuencia. Esta regulación y coordinación de la expresión de genes codificantes de enzimas detoxificantes, se da en respuesta a antioxidantes, xenobióticos, luz UV y las radiaciones. La inducción de genes vía Nrf2-ARE provee protección a la célula contra el daño por radicales libres, estrés oxidativo y la neoplasia.<sup>[10][11][16]</sup>

### **Vía Receptor de hidrocarburos aromáticos (AhR) y el Elemento de Respuesta a Xenobióticos (XRE)**

AhR es un receptor citoplasmático que une principalmente hidrocarburos aromáticos. En condiciones basales, este se halla anclado al citoplasma por la proteína Hsp90. La unión del ligando al receptor provoca la fosforilación del mismo (llevada a cabo por una proteína tirosina quinasa) y su disociación. Una

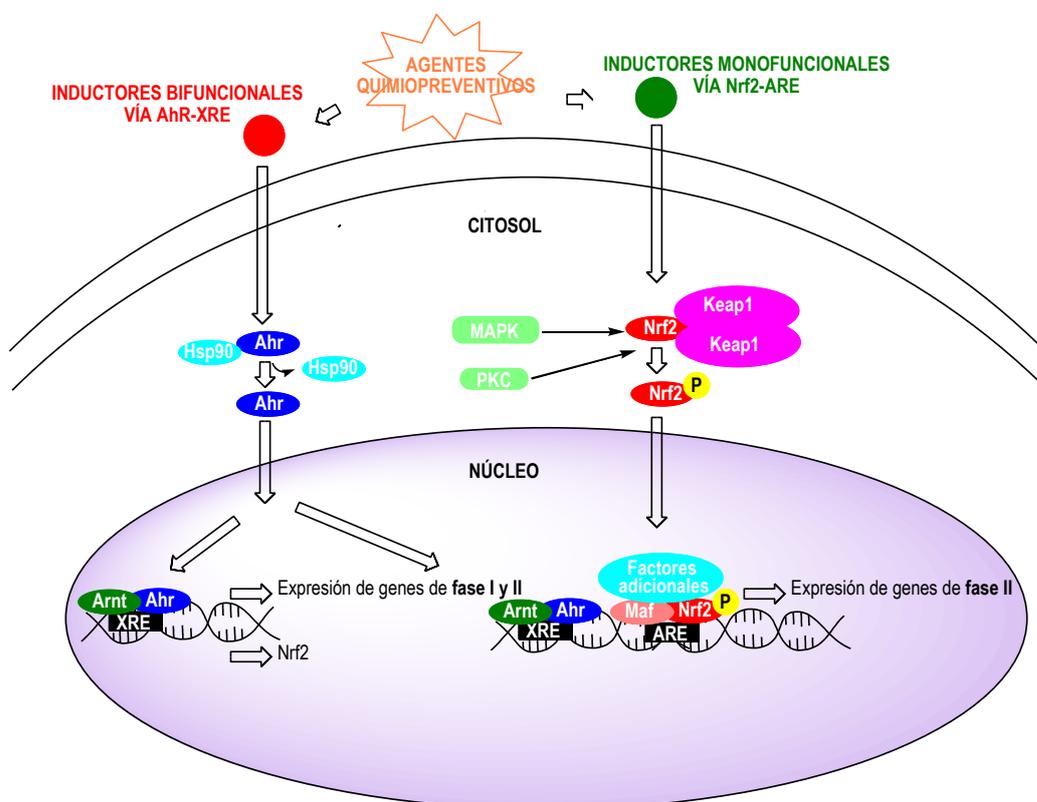
vez liberado el receptor es capaz de unirse al translocador nuclear de AhR (Arnt) formando un complejo AhR-Arnt que es translocado al núcleo y se une a la secuencia XRE (Figura 3).

### El elemento de respuesta a xenobióticos (XRE)

El elemento de respuesta a xenobióticos (XRE) es una pequeña secuencia de ADN 5'-TXGCGTG-3' (siendo x= A o T), que se encuentra en los genes de enzimas detoxificantes de fase I (como son la familia de citocromos P450) y de fase II (QR, GST, UDP-glucoroniltransferasa, Aldehído deshidrogenasa entre otras).

### El complejo AhR-Arnt

Arnt es un componente que bajo control del receptor AhR, se une al ADN activando la transcripción de genes. Para que se forme el heterodimero, el receptor AhR tiene que estar fosforilado y unido a su ligando y Arnt debe estar fosforilado por la proteína PKC (proteína quinasa C). El motivo de unión del complejo al ADN es una estructura hélice-bucle-hélice.<sup>[17][18]</sup>



**Figura 3.** Representación esquemática de la activación de las vías de inducción de genes de enzimas detoxificantes antes descritas (vía AhR-XRE y Nrf2-ARE). Adaptado de referencia 19.

En la **Figura 3** se muestra la inducción de las vías AhR-XRE y Nrf2-ARE, por parte de un inductor bifuncional. En la vía AhR-XRE el inductor se une a AhR lo que facilita la disociación del complejo AhR-Hsp90 y la translocación de AhR-Inductor al núcleo, donde se une a Arnt. Una vez en el núcleo, el complejo AhR-inductor con Arnt se une a las secuencias XRE de los genes de enzimas detoxificantes de

fase I y II, potenciando su transcripción. En caso de la vía Nrf2-ARE, el inductor modifica la proteína Keap1 en sus residuos expuestos de cisteína lo que provoca la liberación de Nrf2 que es ahora capaz de ingresar al núcleo. Una vez allí, Nrf2 se une a Maf y otros factores de transcripción y se une a la secuencia ARE de los genes de enzimas detoxificantes de fase II, potenciando su transcripción.<sup>[19]</sup>

## TIPOS DE INDUCTORES DE ENZIMAS DETOXIFICANTES

Inductores bifuncionales: los inductores bifuncionales son compuestos que contienen en su estructura hidrocarburos policíclicos aromáticos, dioxinas, entre otros. Son capaces de provocar la inducción de genes de enzimas detoxificantes de fase I y de fase II, uniéndose al receptor AhR y provocando la transcripción de genes que contienen la secuencia XRE, a través de la vía AhR-XRE.

Inductores monofuncionales: son compuestos que inducen activación de genes de enzimas detoxificantes de fase II a través del elemento de respuesta a antioxidantes ARE, vía Nrf2-ARE. Esto supone una gran ventaja ya que mediante estos compuestos se evita la activación de enzimas de la familia de citocromos P450 que metabolizan xenobióticos convirtiéndolos en compuestos más tóxicos.<sup>[20]</sup>

### Inductores de enzimas detoxificantes (naturales y sintéticos)

Hasta el momento se han descrito una gran variedad de compuestos naturales y sintéticos capaces de inducir la expresión de enzimas detoxificantes. Entre los compuestos naturales más comunes se encuentran estructuras químicas tales como, isotiocinatos, fenilisotiocinatos (presentes en varios vegetales), sulfuros dialílicos (presentes en ajo y cebolla), lactonas, tiocarbamatos, flavonoides como Quercetina (presentes en cebollas, manzanas, té, brocolí) y Curcumina (presente en curry) (**Figura 4a**). Los resultados obtenidos en compuestos naturales han despertado el interés de crear análogos químicos para evaluar su capacidad como inductores. Entre los derivados de flavonoides se han identificado diversas chalconas como inductores. Un análogo sintético de flavonoide que ha sido mejor caracterizado como inductor de enzimas detoxificantes de xenobióticos, es la 4'-bromoflavona (Fv4Br). Estudios han demostrado que el análogo sintético de hidroquinona *tert*-butilhidroquina (*t*-BHQ) es capaz de inducir actividad de enzimas detoxificantes como QR(**Figura 4b**). Además de los inductores exógenos también existen inductores endógenos, como las prostaglandinas, capaces de inducir enzimas detoxificantes de fase II,<sup>[10][16][21][22][23][24]</sup>

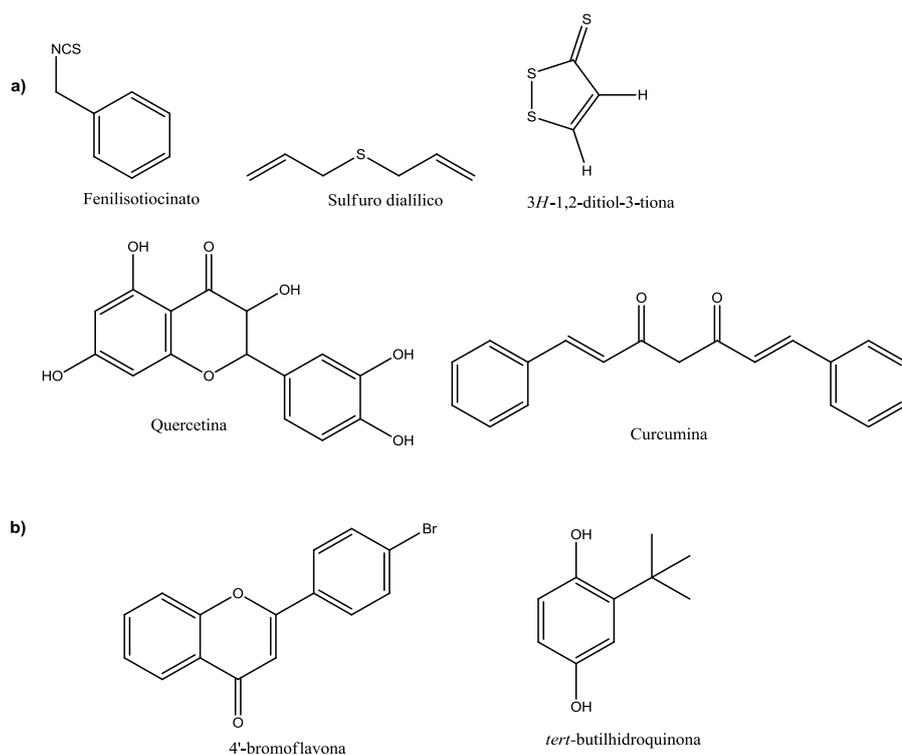


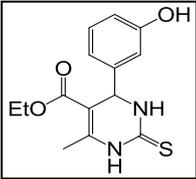
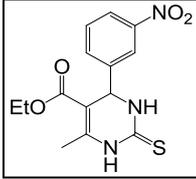
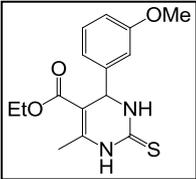
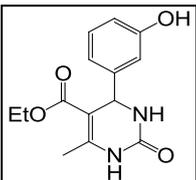
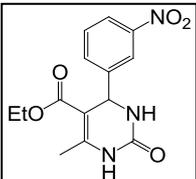
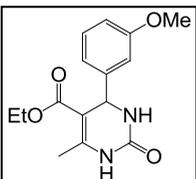
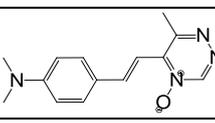
Figura 4. Ejemplos característicos de inductores de enzimas detoxificantes, (a) naturales y (b) sintéticos.

Antecedentes

---

Recientemente a partir de un tamizaje primario, evaluando actividad QR monofuncional vía Nrf2-ARE, de 30 compuestos pertenecientes a 14 quimiotipos diferentes, por parte del grupo de Química Medicinal de Facultad de Ciencias-UdelaR, se han encontrado dos nuevos *hits* moleculares: Tetrahidropirimidinonas (THP) y *N*<sup>4</sup>-óxido de 1,2,4-triazina (NOT)<sup>[25]</sup> (Tabla 1).

Tabla 1. Resultados obtenidos para diferentes THPs y NOTs a partir del tamizaje masivo, a dosis fija (10µM), de la quimioteca.

| Ref.     | Quimiotipo  | Estructura  | Tasa de inducción de QR |   |
|----------|---|---|-------------------------|---|
|          |   |   | Hepa1c1c7               | BprC1   |
| Lasom 61 | THP   |    | Hepa1c1c7               | BprC1   |
|          |   |   | 1.33±0.01               | 1.46±0.05   |
| Lasom 65 |   |    | 1.47±0.11               | 2.09±0.06   |
|          |   |   | Lasom 97                |   |
| Lasom 66 |   |  |                         |   |
|          |   |   | Lasom 67                |  |
| Lasom 98 |   |  |                         |   |
|          |   |   | Q16                     | NOT   |
| Q17      |  | 2.08 ± 0.21   |                         |   |

En la **Tabla 1** se muestran los principales resultados obtenidos para diferentes THPs, análogos y NOTs, a partir de un tamizaje masivo evaluando los compuestos a dosis fija (10  $\mu$ M) sobre las cepas Hepa1c1c7 y BprC1. Los resultados se expresan como Tasa de inducción de QR, es decir Act QR células tratadas/ Act QR células sin tratamiento. De esta manera, si se obtienen valores superiores a 1, puede afirmarse que el compuesto en cuestión es inductor de QR en esas condiciones. Puede observarse que hay tres tipos de resultados: 1) inductores de tipo bifuncionales que inducen QR solo en Hepa1c1c7 (ejemplo: **Lasom67**) o cuya inducción en Hepa1c1c7 es significativamente mayor que en BprC1 (ejemplo: **Q17**); 2) inductores monofuncionales que inducen QR en ambas cepas y casi con la misma potencia (ejemplo: **Q16**). 3) Por último, se encuentra un tipo de inductores especiales de los cuales, *a priori*, no se conoce el mecanismo involucrado por el cual inducen QR con mayor potencia en la cepa mutante (BprC1) que en Hepa1c1c7 (ejemplo: **Lasom65**). Si bien no se han encontrado en literatura análogos de pirimidinas descritos como inductores de enzimas detoxificantes de xenobióticos, éstos han sido estudiados por su actividad quimioterápica contra el cáncer como inhibidores de la topoisomerasa I y de la tirosinasa.<sup>[26][27]</sup> Algunas de las THPs mostradas en la **Tabla 1** se han descrito por su actividad citotóxica frente a líneas celulares tumorales.<sup>[28][29]</sup> En cuanto a los derivados de NOTs, tampoco se han encontrado en literatura evidencias de las mismas como agentes quimiopreventivos pero sí han sido descrito como potentes agentes citotóxicos en condiciones de hipoxia tumoral.<sup>[30]</sup> Esta diversidad de resultados despierta el interés de evaluar diferentes THPs y NOTs como posibles inductores de QR e indagar sobre que propiedades moleculares que hacen a un inductor monofuncional, bifuncional o especial.

Por lo tanto, en este trabajo se busca nuevos inductores monofuncionales que provoquen selectivamente la inducción de enzimas detoxificantes de fase II, sin modificar los sistemas oxidativos de fase I y la determinación de la capacidad de los mismos de actuar como potenciales agentes quimiopreventivos contra el cáncer.

## Objetivos

---

## OBJETIVO GENERAL

Evaluación de una serie de compuestos derivados de Tetrahidropirimidinonas (THP) y *N*<sup>4</sup>-óxido de 1,2,4-triazina (NOT) como posibles inductores selectivos (inductores monofuncionales) de enzimas detoxificantes de fase II, como son Glutati6n-S-Transferasa (GST) y Quinona Reductasa (QR). Se ha demostrado que el incremento de actividad de las mismas, se correlaciona con la protecci6n frente a la carcin6genesis inducida qu6micamente.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

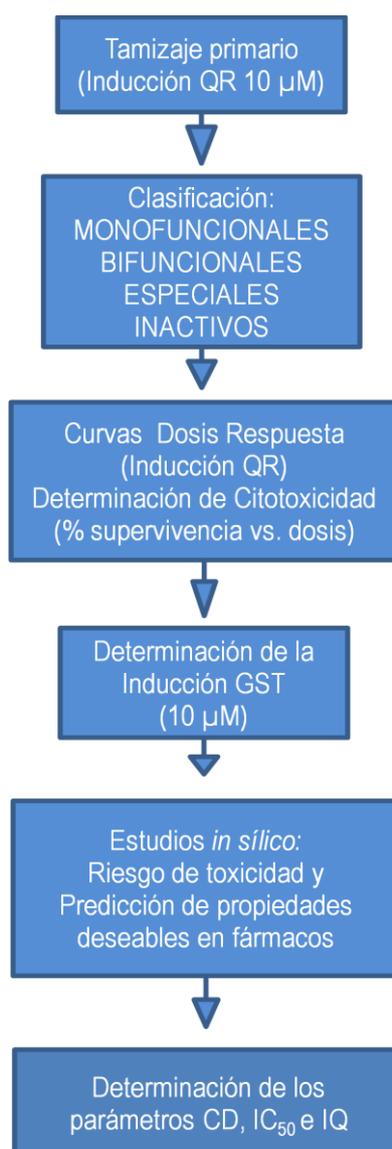
- 1) Evaluaci6n sistemática de nuevos derivados de THP y NOT en un modelo *in vitro* que permite seleccionar inductores monofuncionales, determinando la inducci6n de QR a una dosis de 10 µM.
- 2) Determinaci6n de la concentraci6n a la que los compuestos que resulten más relevantes, duplican la actividad enzimática de QR (CD).
- 3) Determinaci6n de la concentraci6n a la que los compuestos producen el 50 % de citotoxicidad (IC<sub>50</sub>), para aquellos que resulten relevantes.
- 4) Para aquellos compuestos de interés, determinar el Índice de Quimioprevenci6n(IQ): 
$$\text{IQ} = \frac{IC_{50}}{CD}$$
- 5) Determinaci6n de la inducci6n de GST por parte de los compuestos que resultaron exitosos en la inducci6n de QR.
- 6) Estudios *in silico* de predicci6n de propiedades fisicoqu6micas deseables para candidatos a fármacos y determinaci6n del riesgo de toxicidad.

Plan de trabajo

---

## Plan de trabajo

De modo de cumplir con los objetivos específicos planteados se propone el siguiente plan de trabajo esquematizando las actividades llevadas a cabo en el orden en que fueron realizadas (**Esquema 1**). Se realizó en principio un tamizaje primario que permitió identificar los distintos tipos de inductores. Posteriormente se realizaron curvas de dosis respuesta y citotoxicidad de aquellos que resultaron más relevantes. Luego se determinó la inducción de GST por parte de los mismos. Se realizaron ensayos *in silico* para determinar propiedades fisicoquímicas deseables desde el punto de vista farmacológico y evaluar riesgos de toxicidad. Finalmente se determinó CD e IC<sub>50</sub> para poder determinar IQ de los compuestos más interesantes.



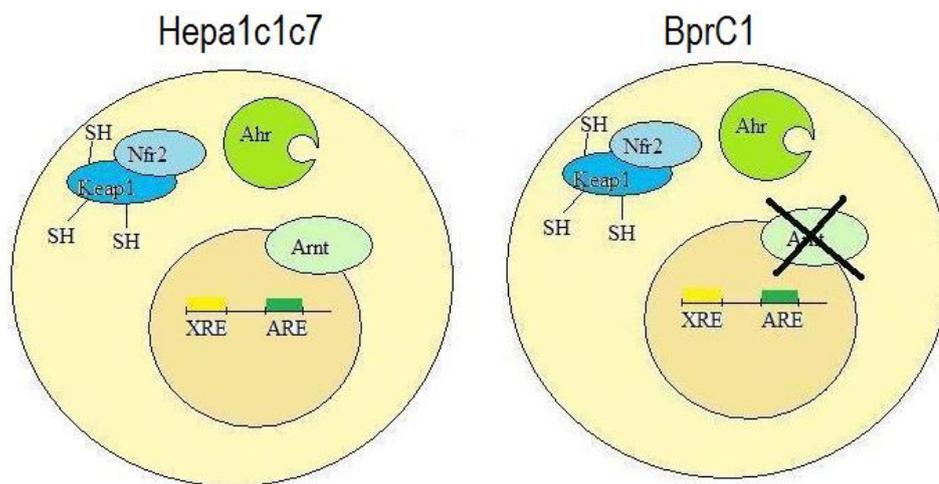
**Esquema 1.** Diagrama de bloques esquematizando el orden en el que se realizaron las actividades previstas para cumplir los objetivos específicos.

## Resultados y Discusión

---

## Modelo celular

Con objetivo de determinar si los compuestos son capaces de inducir actividad enzimática de enzimas detoxificantes y predecir los mecanismos moleculares involucrados se realizaron ensayos *in vitro* sobre dos líneas celulares, que permiten evaluar la selectividad en la inducción de actividad enzimática por parte de los compuestos. La cepa salvaje (*wt*) Hepa1c1c7 proveniente de hepatoma de ratón que presenta morfología de tipo epitelial. Son células altamente inducibles para Citocromo P450 (CYP450), por lo que resultan útiles para estudiar la vía AhR-XRE. La otra cepa es una variante de Hepa1c1c7 denominada BprC1 que se diferencia de la primera por presentar la proteína translocadora de AhR trunca.<sup>[31][32]</sup>



**Figura 5.** Esquema de las líneas celulares empleadas (la cepa salvaje Hepa1c1c7 y la mutante de ésta, BprC1).

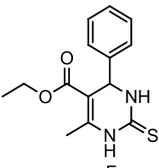
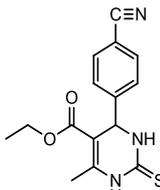
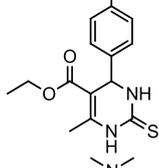
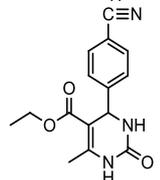
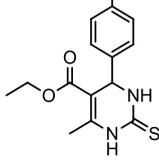
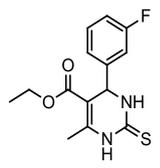
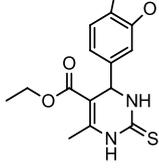
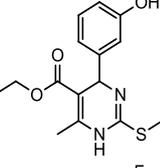
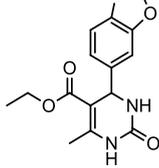
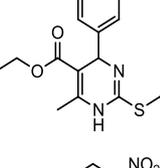
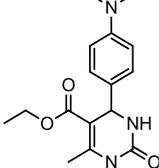
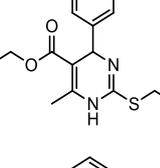
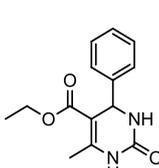
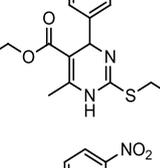
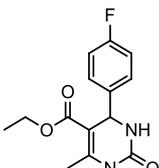
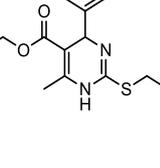
En la **Figura 5** se muestra a modo representativo, un esquema con la diferencia entre las líneas celulares empleadas. Puede apreciarse que en la cepa mutante, la proteína translocadora de AhR (Arnt) se encuentra inactiva, por lo que BprC1 es deficiente en la translocación al núcleo del receptor de hidrocarburos aromáticos (AhR) o dicho de otra manera, la vía AhR-XRE está inactiva. De esta manera se puede comparar la actividad enzimática obtenida en ambas cepas y estimar los mecanismos involucrados en la activación de genes de enzimas detoxificantes de xenobióticos.<sup>[32]</sup>

## Inducción de QR por THPs y derivados

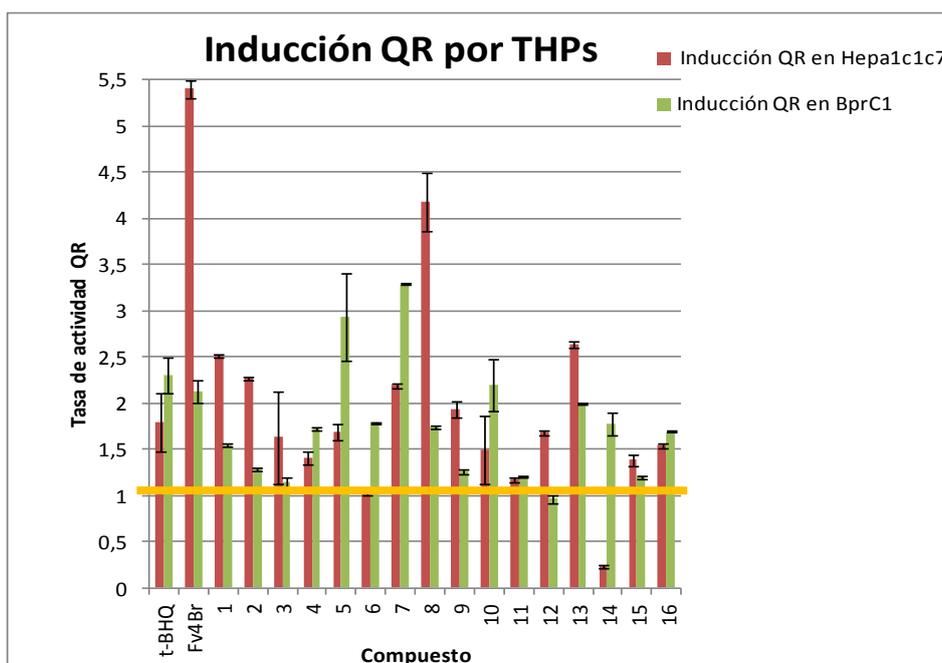
Como se mencionó en la sección Antecedentes, en estudios previos realizados por el Grupo de Química Medicinal surgieron estructuras relevantes como *hits* moleculares, así se seleccionaron derivados de THP para seguir siendo evaluados como posibles inductores de enzimas detoxificantes de fase II. Para ello se seleccionaron 16 derivados de THP de la quimioteca del Laboratorio de Síntesis Orgánica Medicinal-Universidad Federal de Río Grande del Sur (**Tabla 2** página siguiente). Todos los THPs seleccionados poseen fenilos en posición 4 del heterociclo, sustituidos o no en posición *meta* o *para* (**1-16**). Se incluyeron sustituyentes con diversas propiedades estereo-electrónicas y se estudió además el efecto de la sustitución bioisostérica del carbonilo de las THPs por tiocarbonilo (tetrahidropirimidintionas **5, 6, 7, 8** y **10**) y se evaluaron además derivados S-alkilados a este nivel (**12-16**).

En la **Tabla 2** se muestran los resultados de tasa de actividad de QR  $\pm$  DS obtenidos a partir de un ensayo a modo de tamizaje primario, evaluando los compuestos a dosis fija (10 $\mu$ M). Se incluye los resultados del inductor bifuncional 4'-Bromoflavona (Fv4Br) y del inductor monofuncional *tert*-butilhidroquinona (*t*-BHQ) como controles positivos del ensayo. *A priori* puede decirse que la mayoría de los compuestos fueron inductores de QR en ambas cepas pero presentan distintos comportamientos. Los resultados obtenidos muestran que las THPs ensayadas presentan los tres comportamientos característicos antes mencionados (ver Antecedentes): Inductores monofuncionales (**1, 4, 7, 10, 11, 13, 15** y **16**), inductores bifuncionales (**2, 3, 8, 9** y **12**), inductores especiales (**5** y **6**). Sin embargo todos los derivados ensayados merecen ser considerados, ya que a excepción de **14**, todos producen inducción enzimática en diferente medida, en ambas a cepas.

**Tabla 2.** Tamizaje inicial actividad QR inducida por los compuestos **1,2,3,4-tetrahidropirimidinonas** (THPs) evaluados a dosis fija (10  $\mu$ M). Se presentan los resultados como tasa de actividad QR(células tratadas/células control)  $\pm$  DS.

| Compuesto | Estructura  | Tasa de actividad de QR |                 | Compuesto | Estructura   | Tasa de actividad de QR |                 |
|-----------|---|-------------------------|-----------------|-----------|--|-------------------------|-----------------|
|           |   | Hepa1c1c7               | BprC1           |           |  | Hepa1c1c7               | BprC1           |
| 1         |    | 2,51 $\pm$ 0,01         | 1,54 $\pm$ 0,02 | 9         |    | 1,93 $\pm$ 0,09         | 1,26 $\pm$ 0,03 |
| 2         |    | 2,27 $\pm$ 0,02         | 1,28 $\pm$ 0,02 | 10        |    | 1,50 $\pm$ 0,37         | 2,19 $\pm$ 0,28 |
| 3         |    | 1,63 $\pm$ 0,50         | 1,14 $\pm$ 0,06 | 11        |    | 1,17 $\pm$ 0,02         | 1,20 $\pm$ 0,01 |
| 4         |   | 1,41 $\pm$ 0,07         | 1,72 $\pm$ 0,01 | 12        |   | 1,68 $\pm$ 0,03         | 0,96 $\pm$ 0,04 |
| 5         |  | 1,69 $\pm$ 0,09         | 2,93 $\pm$ 0,48 | 13        |  | 2,63 $\pm$ 0,04         | 1,99 $\pm$ 0,01 |
| 6         |  | 1,02 $\pm$ 0,02         | 1,79 $\pm$ 0,01 | 14        |  | 0,23 $\pm$ 0,01         | 1,77 $\pm$ 0,12 |
| 7         |  | 2,19 $\pm$ 0,03         | 3,29 $\pm$ 0,01 | 15        |  | 1,38 $\pm$ 0,06         | 1,19 $\pm$ 0,02 |
| 8         |  | 4,18 $\pm$ 0,32         | 1,74 $\pm$ 0,02 | 16        |  | 1,54 $\pm$ 0,03         | 1,69 $\pm$ 0,01 |

**NOTA:** Aquellos inductores con carácter bifuncional o especial que provoquen inducción mayor o igual al 50% en ambas cepas respecto al control negativo, serán considerados inductores monofuncionales siempre y cuando la actividad en una línea no triplique la de la otra.



**Figura 6.** Representación gráfica de la inducción de QR por parte de los compuestos 1-16, evaluados a modo de screening primario, a dosis fija (10  $\mu$ M) en ambas cepas (Hepa1c1c7 y BprC1), con sus respectivos desvíos estándar. Se muestran la inducción de QR por parte de Fv4Br, inductor bifuncional y *t*-BHQ, inductor monofuncional (controles positivos).

En la **Figura 6** se representa gráficamente los resultados obtenidos en el ensayo a modo de tamizaje primario a dosis fija 10  $\mu$ M para los compuestos 1-16 con sus respectivas desviaciones estándar (DS). Se incluye los resultados del inductor bifuncional 4'-Bromoflavona (Fv4Br) y del inductor monofuncional *tert*-butilhidroquinona (*t*-BHQ) como controles positivos del ensayo. Cuando se comparan los resultados obtenidos para los compuestos sin sustituyentes a nivel de fenilo en posición 4, los derivados **1**, **7** y **15** (ver **Tabla 2**) se observa que difieren en la presencia de tiocarbonilo (**1**), carbonilo (**7**) y S-etilo en posición 2 del heterociclo (**15**) y presentan diferentes características de inducción. El compuesto **1** presentó una tendencia de mayor inducción de actividad en Hepa1c1c7 que en BprC1, pero se considera un inductor monofuncional debido a la potencia con la que induce actividad de QR en ambas cepas. En caso de **7**, si bien la inducción de QR fue mayor en la cepa mutante que en la salvaje se considera un inductor con carácter monofuncional debido a las elevadas tasas de inducción registradas en Hepa1c1c7 (2,2) y BprC1 (3,3). El derivado **15**, aunque es un inductor débil presenta el comportamiento deseado, es decir es inductor de QR y a la vez monofuncional, ya que la actividad inducida en ambas cepas es similar (ver **Tabla 2**). Relacionando la estructura con la actividad inducida por dichos compuestos, parece indicar que la presencia del grupo carbonilo (**7**) aumenta la potencia, comparada con aquel sustituido por un tiocarbonilo (**1**) en el que la actividad en BprC1 baja y cuando se S-sustituye (**15**) se observa una clara disminución de la inducción para ambas cepas. En caso de **1** y **15**, puede observarse que la S-alquilación del tiocarbonilo (**15**) si bien disminuye la inducción de actividad enzimática, contribuye a que el

compuesto presente inducción de actividad enzimática prácticamente con la misma potencia en ambas cepas.

Cuando se comparan los derivados fluorados **2** y **8** (ver **Tabla 2**) se observa que ambos presentan comportamiento de tipo bifuncional, pero en caso de **2**, la inducción en la actividad en Hepa1c1c7 y BprC1 fue menor en comparación de **8**. Este resultado sugiere que la sustitución de carbonilo por tiocarbonilo disminuye la inducción de QR por parte del compuesto.

En el caso de los derivados dimetilados **3** y **6**, el primero presenta un comportamiento bifuncional, mientras que el último es un inductor de tipo especial. Si se analiza la tasa de inducción en BprC1 por parte de **3** (1,14) y de **6** (1,79), la presencia de carbonilo parece seguir contribuyendo a la actividad deseada. Los derivados dioxolanos **4** y **5** (ver **Tabla 2**) se diferencian por la presencia de tiocarbonilo (**4**) y carbonilo (**5**) y en ambos casos fueron inductores especiales y como ocurría anteriormente, el compuesto que presenta el carbonilo (**5**) fue potencialmente mejor inductor en ambas cepas.

Para los derivados nitrilos **9** y **10** (ver **Tabla 2**) se observa un comportamiento de tipo bifuncional para el primero y monofuncional para el último. En este caso la sustitución del carbonilo por tiocarbonilo modificó el comportamiento de la molécula como inductor de QR, favoreciendo el comportamiento deseado. Cabe mencionar que la carbonilación como en los demás casos estudiados mejora la inducción de actividad QR aumentando éste principalmente en la cepa mutante.

En el caso de los THPs sustituidas con *m*-fluorofenilo **11** y **13** (ver **Tabla 2**) puede observarse que éste último, *S*-alquilado, resultó más activo que **11**. Puede concluirse entonces que en general la *S*-alquilación favorece el comportamiento ya sea modificando la tendencia del compuesto hacia el comportamiento deseado (**1** y **15**) o mejorando la tasa de inducción de QR (**11** y **13**). El derivado **14** presenta una característica diferente a los demás, ya que es el único compuesto *S*-bencilado. **14** no es inductor de QR en Hepa1c1c7, probablemente la baja tasa registrada resulte de una citotoxicidad sobre esta línea a la dosis evaluada (no comprobado), pero sin embargo si resultó ser inductor en la cepa mutante (BprC1) con una tasa de 1,77. Si lo comparamos con **16**, claramente la *S*-bencilación no favorece a la actividad deseada (ver **Tabla 2**).

En cuanto a las propiedades electrónicas de los compuestos se observa que los derivados que presentan tiocarbonilo (**1**) y carbonilo (**7**) y no poseen sustituyentes en posición 4 del fenilo, muestran una mejor tasa de inducción de QR (ver **Tabla 2**) en comparación con sus análogos sustituidos en la misma posición (**3** y **9**, **6** y **10** respectivamente). Además, existe una tendencia de mayor inducción por parte de aquellos que poseen sustituyentes electrón aceptores por efecto resonante (**9** y **10**) en comparación de aquellos cuyos sustituyentes tienen efecto resonante electrón dador (**3** y **6**).

## Curvas de dosis respuesta y citotoxicidad de THPs

Se seleccionaron tres compuestos representativos con inducción monofuncional de acuerdo al tamizaje primario: el derivado **1** conteniendo tiocarbonilo, su análogo **7** con carbonilo y **15** S-alkilado. Se evaluó la capacidad de los mismos de inducir QR a distintas concentraciones (20, 10, 8, 5 y 2,5  $\mu\text{M}$ ) en ambas cepas de hematoma de ratón y con los resultados obtenidos de tasa de actividad de QR se construyeron curvas de dosis respuesta de los compuestos. Por otro lado se determinó el porcentaje de supervivencia celular a distintas concentraciones del producto (200, 100, 75, 50, 25, 10, 2,5 y 1  $\mu\text{M}$ ) y se construyeron curvas de citotoxicidad, en donde se visualiza la variación de la supervivencia celular con las concentraciones.

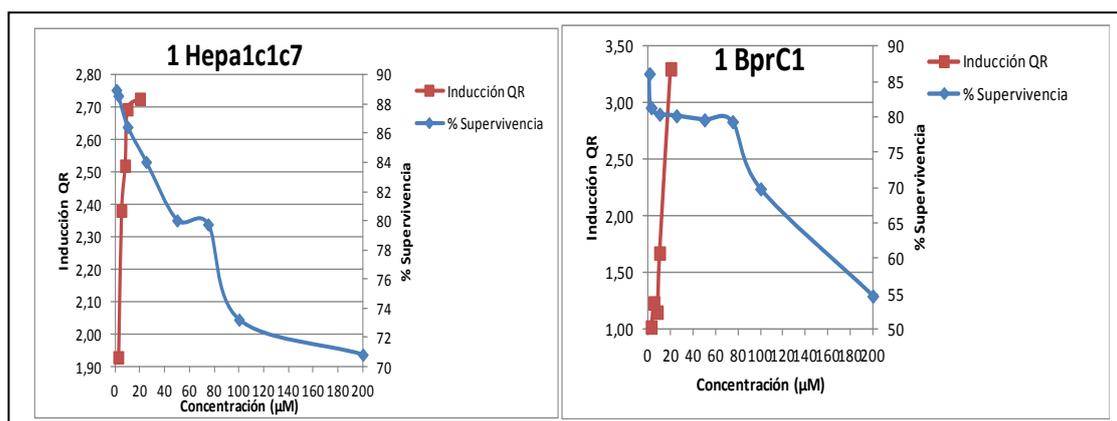


Figura 7. Curvas de dosis respuesta (en rojo) y de citotoxicidad (en azul) obtenidas para **1**. En ninguno de los casos se excede el 20% de DS.

Como ya se mencionó el derivado **1** (ver **Tabla 2**) resultó ser potencialmente activo en ambas cepas en el ensayo de tamizaje a dosis fija (10  $\mu\text{M}$ ), por lo que resulta interesante evaluar su capacidad de inducción a distintas concentraciones. Como era de esperarse, el derivado **1** fue más activo en Hepa1c1c7 que en BprC1 en la mayoría de las concentraciones evaluadas pero se observa que a 20  $\mu\text{M}$  la inducción en la cepa salvaje se mantiene casi estacionaria, mientras que en BprC1 aumenta significativamente lo que resulta relevante para el comportamiento deseado. En cuanto a la citotoxicidad, el compuesto resultó ser algo más citotóxico en la cepa mutante en comparación de lo que ocurre en la salvaje, lo que puede apreciarse comparando el % de supervivencia alcanzado a la mayor concentración evaluada (200  $\mu\text{M}$ ) en ambas cepas. Sin embargo la curva de citotoxicidad varía ligeramente en ambas cepas siendo más abrupta la citotoxicidad con el aumento de la concentración en Hepa1c1c7 con respecto a BprC1 en que se registra una fase casi sin fluctuaciones entre 2,5 y 50  $\mu\text{M}$  (**Figura 7**).

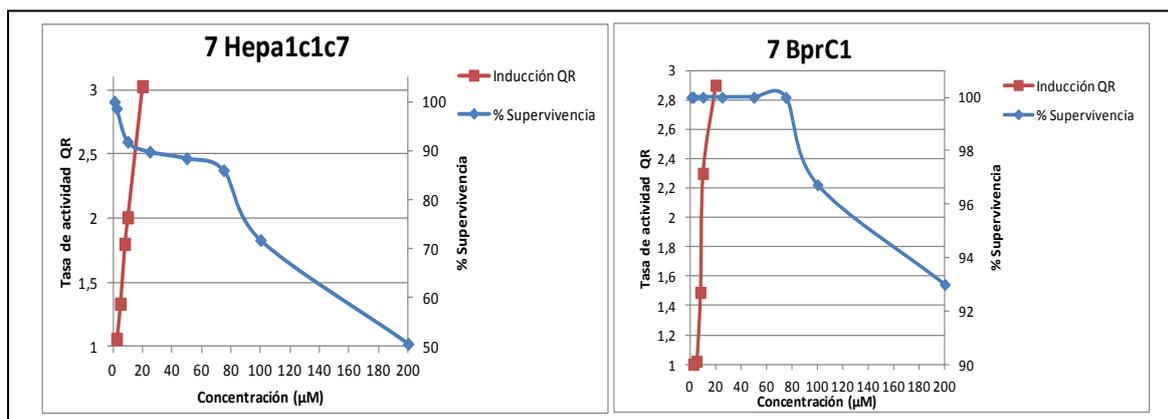


Figura 8. Curvas de dosis respuesta (en rojo) y de citotoxicidad (en azul) obtenidas para 7. En ninguno de los casos se excede el 20% de DS.

El compuesto 7 (Figura 8), como ya se mencionó tiene una tendencia a comportarse como monofuncional debido a las altas tasas de inducción registradas en ambas cepas, pero mostró en el tamizaje a dosis fija (10 μM) ser algo más inductor en BprC1. Esto se repitió en el ensayo de dosis respuesta a la misma concentración. Pero se observó que al duplicar la concentración, aumenta pronunciadamente la actividad de QR en Hepa1c1c7 obteniéndose una tasa de actividad de QR similar a la obtenida en BprC1 a la misma concentración, lo que se correlaciona con el comportamiento buscado y afirma el carácter monofuncional del compuesto. En cuanto a la citotoxicidad, éste fue significativamente más citotóxico en la cepa salvaje, lo que de cierta manera parece contribuir al comportamiento especial observado.

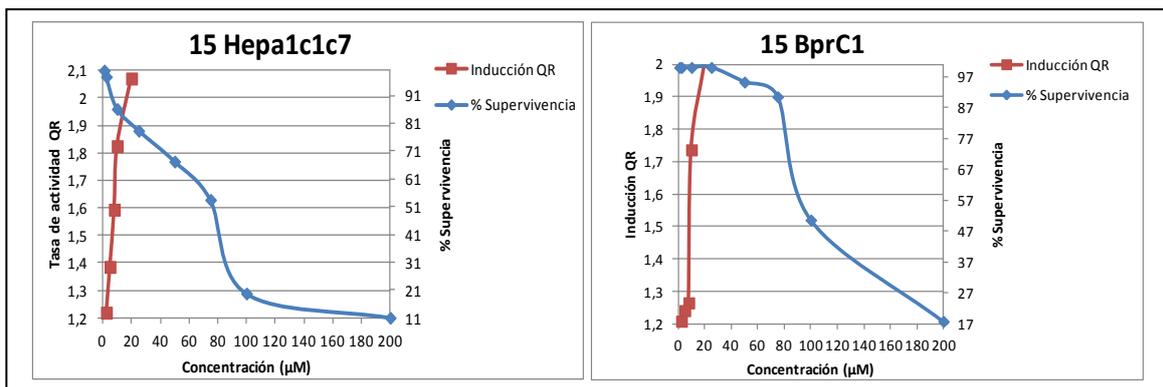


Figura 9. Curvas de dosis respuesta (en rojo) y de citotoxicidad (en azul) obtenidas para 15. Se grafica, a modo de ejemplo ilustrativo, % supervivencia e inducción QR vs concentración del producto. En ninguno de los casos se excede el 20% de DS.

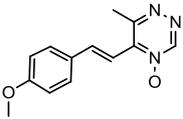
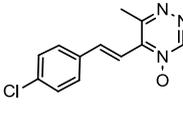
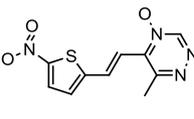
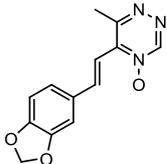
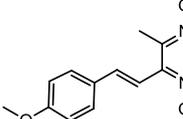
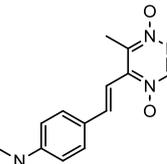
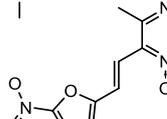
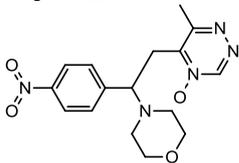
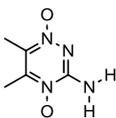
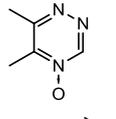
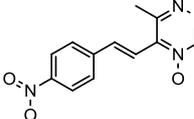
En caso de 15 (Figura 9) fue inductor de QR en ambas cepas para todas las concentraciones ensayadas y ésta inducción aumentaba al aumentar la concentración del mismo en el rango de concentraciones evaluadas. En cuanto a la citotoxicidad, el compuesto resultó ser citotóxico en ambas cepas y si se observan las tendencias de las curvas de citotoxicidad, claramente éste fue algo más citotóxico en Hepa1c1c7 que en BprC1.

Los resultados obtenidos para **1**, **7** y **15** sugieren que, evaluar a distintas concentraciones permite identificar tendencias en cuanto a la inducción de actividad enzimática que no se observaban en el ensayo a dosis fija. En cuanto a las diferencias estructurales, se observa nuevamente que la presencia de carbonilo (**7**) se correlaciona a una mayor inducción de actividad enzimática de QR. Sustituir éste por tiocarbonilo (**1**) disminuye levemente la actividad observada en ambas cepas. En cuanto a la S-alquilación (**15**), como ya se mencionó, se observa que parece contribuir al comportamiento buscado.

## Inducción de QR por NOTs

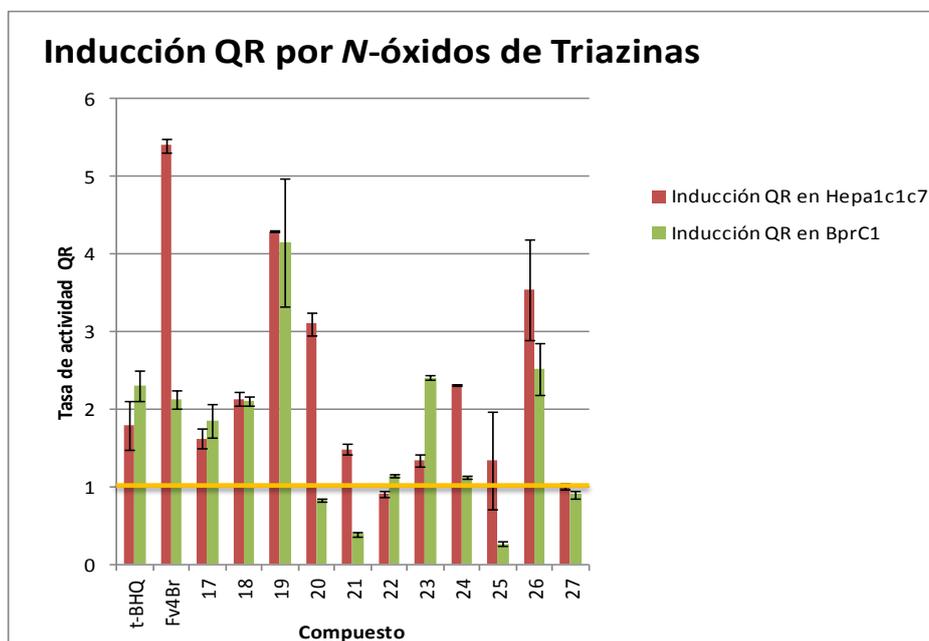
Como se discutió previamente, a partir de estudios de nuestro grupo surge el agrupamiento  $N^4$ -óxido de 1,2,4-triazina (NOT, **Q16** y **Q17**, **Tabla 1** página 21) como nuevo farmacóforo modulador de enzimas detoxificantes de xenobióticos. Con el fin de comprender los requerimientos estructurales que influyen en esta actividad se estudian 11 nuevos derivados de la quimioteca de Grupo de Química Medicinal-UdelaR en cuanto a su capacidad inductora de enzimas de fase I y II. En la tabla 3 se muestran las estructuras de las 11 NOTs seleccionadas en este trabajo de tesina. Así se incluye el derivado **26** como representante estructural mínimo del heterociclo NOT y el compuesto **25** para estudiar la influencia de la  $N$ -oxidación de un segundo N del heterociclo, en particular de  $N^1N^4$ -dióxido de 1,2,4-triazina. También se estudian otros análogos de los derivados **Q16** y **Q17**, es decir compuestos de estructura general 5-ariletenil- $N^4$ -óxido de 1,2,4-triazina (**17-20**, **23** y **27**) y dos análogos dioxidados, de estructura general 5-ariletenil- $N^1, N^4$ -dióxido de 1,2,4-triazina (**21** y **22**). En estos dos últimos casos se intenta cubrir distintas propiedades estereo-electrónicas variando la sustitución del grupo arilo (fenilo, tienilo y furilo). También se incluye el derivado **24** de estructura general feniletil- $N^1-N^4$ -óxido de 1,2,4-triazina de forma de estudiar la influencia de la presencia del doble enlace en el conector hidrocarbonado entre la triazina y el fenilo. Una saturación a este nivel impide la deslocalización electrónica por resonancia entre la triazina y el fenilo, influenciando entre otras propiedades la planaridad y rigidez de la molécula. Por otra parte el ariletenil triazina puede ser considerada como un agrupamiento aceptor de Michael, lo que ha sido reconocido en chalconas desarrollados en nuestro grupo como inductoras de enzimas detoxificadoras.<sup>[21] [32]</sup> En la **Tabla 3** se muestran los resultados de tasa de actividad de QR $\pm$ DS obtenidos a partir de un tamizaje a dosis fija 10  $\mu$ M en ambas cepas de hepatoma ratón .

**Tabla 3.** Tamizaje de actividad QR inducida por los N-óxidos de triazinas evaluados a dosis fija (10  $\mu$ M). Se presentan los resultados como tasa de actividad QR(células tratadas/células control)  $\pm$  DS.

| Compuesto | Estructura  | Tasa de actividad de QR |                  |
|-----------|---|-------------------------|------------------|
|           |   | Hepa1c1c7               | BprC1            |
| 17        |    | 1,62 $\pm$ 0,13         | 1,85 $\pm$ 0,22  |
| 18        |    | 2,13 $\pm$ 0,09         | 2,10 $\pm$ 0,06  |
| 19        |    | 4,29 $\pm$ 0,01         | 4,15 $\pm$ 0,82  |
| 20        |    | 3,10 $\pm$ 0,14         | 0,83 $\pm$ 0,02  |
| 21        |   | 1,48 $\pm$ 0,07         | 0,39 $\pm$ 0,003 |
| 22        |  | 0,91 $\pm$ 0,04         | 1,15 $\pm$ 0,02  |
| 23        |  | 1,34 $\pm$ 0,07         | 2,41 $\pm$ 0,03  |
| 24        |  | 2,32 $\pm$ 0,01         | 1,13 $\pm$ 0,02  |
| 25        |  | 1,34 $\pm$ 0,62         | 0,27 $\pm$ 0,03  |
| 26        |  | 3,54 $\pm$ 0,64         | 2,52 $\pm$ 0,33  |
| 27        |  | 1,01 $\pm$ 0,04         | 0,90 $\pm$ 0,04  |

**NOTA:** Aquellos inductores con carácter bifuncional o especial que provoquen inducción mayor o igual al 50% en ambas cepas respecto al control negativo, serán considerados inductores monofuncionales siempre y cuando la actividad en una línea no triplique la de la otra.

En la **Tabla 3** se presentan las estructuras de los diferentes NOTs evaluados y los resultados de tasa de actividad de QR $\pm$ DS obtenidos a partir de un tamizaje a dosis fija 10  $\mu$ M. Puede apreciarse que las modificaciones estructurales de los compuestos se dan a nivel del sustituyente en el anillo NOT. En caso de algunos compuestos, presentan dos agrupamientos *N*-óxidos en el anillo, en lugar de uno (**21** y **22**).



**Figura 10.** Representación gráfica de la inducción de QR por parte de los compuestos 17-27, evaluados a modo de tamizaje primario, a dosis fija (10  $\mu$ M) en ambas cepas (Hepa1c1c7 y BprC1), con sus respectivos desvíos estándar. Se muestran la inducción de QR por parte de Fv4Br, inductor bifuncional y t-BHQ, inductor monofuncional (controles positivos).

En la **Figura 10** se presenta la actividad de QR inducida por derivados de *N*-óxidos de triazinas, para ambas cepas (Hepa1c1c7 y BprC1)  $\pm$  DS. Los compuestos se evaluaron a dosis fija a una concentración de 10 $\mu$ M. Puede observarse que nuevamente, como ocurría en el caso de las THPs, se encuentran tres tipos de inductores (ver **Tabla 3**): monofuncionales (**17**, **18**, **19** y **26**), bifuncionales (**20**, **21**, **24**, **25**), especiales (**22** y **23**). El derivado **27**, resultó ser inactivo en ambas cepas. Los productos **17** y **21** son análogos entre sí (ver **Tabla 3**), difieren en que el primero presenta un solo agrupamiento *N*-óxido y el último presenta un di-*N*-óxido. Claramente la presencia de dos *N*-óxidos en **21** es desfavorable en la inducción de QR, ya que el compuesto **17** fue inductor de la enzima en ambas cepas, mientras que **21** presenta un comportamiento bifuncional. Esto destaca la importancia de la presencia de un único *N*-óxido en la molécula de **17** para su comportamiento monofuncional, ya que al di-*N* oxidarla la vuelve un compuesto de carácter bifuncional.

Para los compuestos **22** y su análogo **Q17**, se observa claramente que el primero prácticamente no induce actividad en ninguna de las dos cepas tratadas, mientras que el último si es inductor de QR en ambas cepas. Esto concuerda con lo antes mencionado de que la presencia de dos *N*-óxidos desfavorece

la inducción de actividad de QR. Aun más, el compuesto **25** que también presenta dos agrupamientos *N*-óxidos, mostró un comportamiento bifuncional, como ocurría con **21**.

Los compuestos **19** y **23** difieren en que el primero presenta un 5-nitrotiofeno en su estructura y el último un 5-nitrofurano. El compuesto **19** presentó una actividad significativa y similar en ambas cepas (ver **Tabla 3**) y por lo tanto puede concluirse que se trata de un compuesto con carácter monofuncional, mientras que en el caso de **23** la actividad fue significativamente menor en comparación con **19**. Por lo tanto, la modificación tiofeno-furano no es favorable para la inducción de actividad enzimática de QR buscada.

En el caso de **20**, conteniendo un grupo etenilbenzo-1,2-oxadiazol, se trata de un compuesto con carácter bifuncional, lo que podría atribuirse a la presencia de éste sustituyente, ya que cuando se cambia por H (**Q16**) el comportamiento es monofuncional.

La sustitución en el anillo de benceno no es desfavorable en todos los casos, sino que más bien depende de las características del sustituyente. Tal es el caso de **18** que posee un cloro en la posición *para* del anillo y es un compuesto monofuncional, con una inducción más significativa que **Q17**. Comparando **27** y **Q16** se observa que el último presenta el comportamiento deseado mientras que el primero es inactivo por lo que claramente la sustitución de un grupo nitro en posición *para* del anillo de benceno desfavorece la inducción de actividad biológica buscada.

El derivado **24** presenta un comportamiento bifuncional, que puede atribuirse a la reducción del grupo etenilo, ya que su análogo **27** fue inactivo. El compuesto **26** fue un potente inductor de la enzima, con un comportamiento monofuncional; observando la estructura del mismo puede concluirse que el heterociclo base *N*<sup>4</sup>-óxido de 1,2,4-triazina 4,5-dimetilado es el principal agrupamiento farmacofórico responsable de la actividad dado que sólo se consigue mejorar la actividad en los casos de los NOTs **18**, **19**.

### Curvas de dosis respuesta y citotoxicidad de NOTs

Se seleccionaron 4 de los 11 compuestos evaluados (**17**, **18**, **19** y **26**) que presentaron el comportamiento deseado, en el ensayo a modo de tamizaje inicial, a dosis fija 10  $\mu\text{M}$ . Se evaluó la capacidad de inducción de actividad de QR por parte del compuesto en ambas cepas de hepatoma de ratón, a distintas concentraciones del mismo (dosis respuesta). Con los resultados obtenidos se construyeron curvas de dosis respuesta: tasa de actividad de QR en función de las distintas concentraciones de los compuestos (20, 10, 8, 5 y 2,5  $\mu\text{M}$ ). A su vez se evaluó la citotoxicidad de los mismos frente a las cepas empleadas, para ello se construyeron curvas de citotoxicidad a partir de los resultados de % de supervivencia obtenidos evaluando los compuestos a 200, 100, 75, 50, 25, 10, 2,5 y 1  $\mu\text{M}$ .

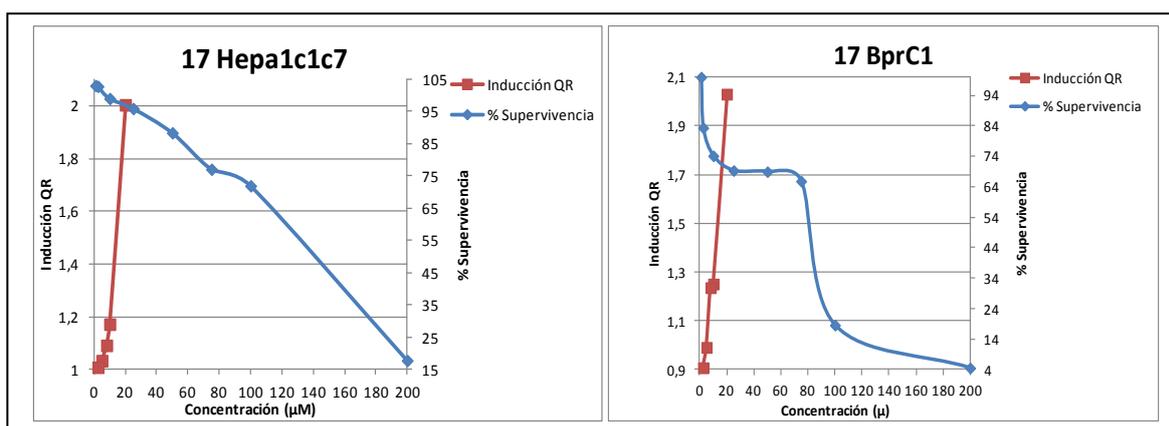


Figura 11. Curvas de dosis respuesta (en rojo) y de citotoxicidad (en azul) obtenidas para 17. En ninguno de los casos se excede el 20% de DS.

En la **Figura 11** se muestra las curvas de dosis respuesta y citotoxicidad obtenidas para 17. Las curvas dosis respuesta presentan una distribución similar para ambas cepas lo que está demostrando su comportamiento monofuncional como se había observado en el estudio a dosis fija. Las curvas de citotoxicidad obtenidas en ambas cepas sugieren que el compuesto resultó ser más tóxico en BprC1 que en Hepa1c1c7, esto puede apreciarse por la caída del % de supervivencia observado en la cepa mutante en comparación con la *wf*. A su vez, la concentración del producto a la cual se duplica la actividad enzimática de QR es menor en Hepa1c1c7 que en BprC1, lo que podría correlacionarse con la toxicidad del compuesto frente a ésta última cepa.

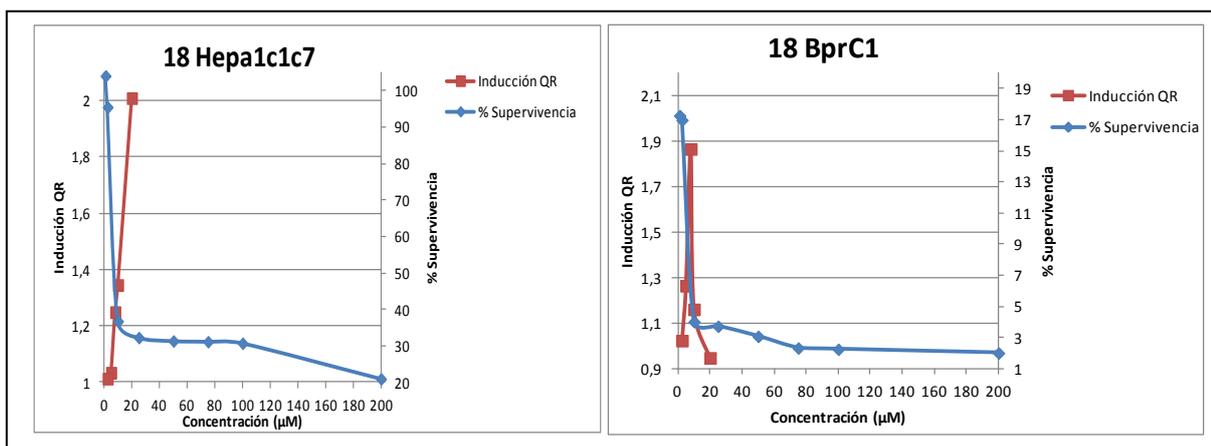


Figura 12. Curvas de dosis respuesta (en rojo) y de citotoxicidad (en azul) obtenidas para **18**. En ninguno de los casos se excede el 20% de DS.

Las curvas de toxicidad obtenidas para el caso de **18** (Figura 12) tienen una tendencia similar, pero el porcentaje de supervivencia es mucho menor en BprC1 que en Hepa1c1c7 para todas las concentraciones ensayadas de producto. Esto indica que el compuesto es potencialmente más tóxico en la cepa mutante. La curva de dosis respuesta en Hepa1c1c7 tiene una tendencia creciente para todas las concentraciones evaluadas. En el caso de BprC1 la ventana terapéutica, es decir el rango en el cual el compuesto no presenta efectos tóxicos, es pequeña por lo que con pequeñas modificaciones en la concentración se observan variaciones en el efecto deseado.

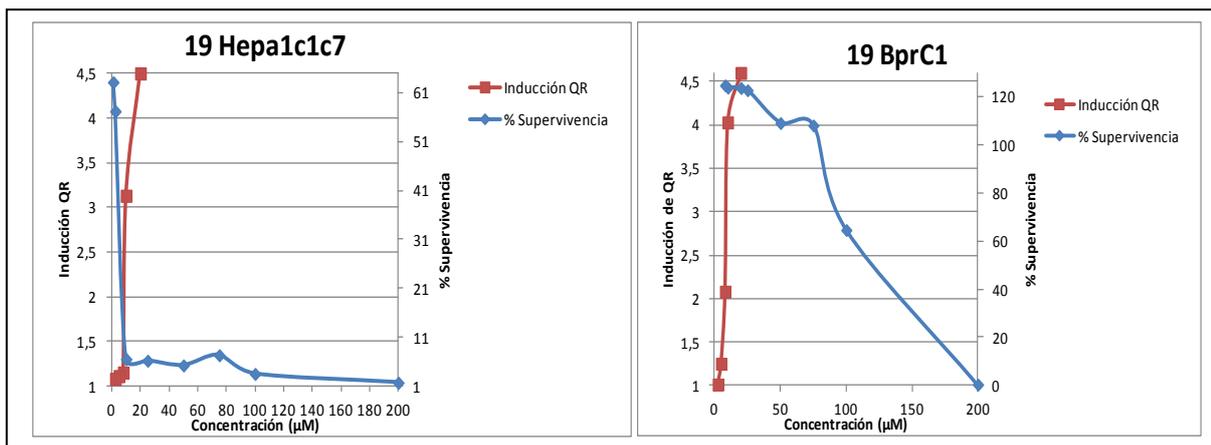


Figura 13. Curvas de dosis respuesta (en rojo) y de citotoxicidad (en azul) obtenidas para **19**. En ninguno de los casos se excede el 20% de DS.

El derivado **19** (Figura 13) mostró un decaimiento en el porcentaje de supervivencia mucho más pronunciado en Hepa1c1c7 que en BprC1. En otras palabras, el compuesto resultó ser mucho más citotóxico en la cepa *wt* que en la mutante. En oposición a lo que ocurre con el porcentaje de supervivencia en Hepa1c1c7, el compuesto fue activo en las concentraciones ensayadas lo que muestra la potente capacidad del producto de inducir QR aún cuando el porcentaje de supervivencia celular es bajo. En cambio en caso de BprC1, la actividad inducida de QR se acompaña de un elevado porcentaje de supervivencia en las concentraciones empleadas para evaluar el efecto dosis respuesta.

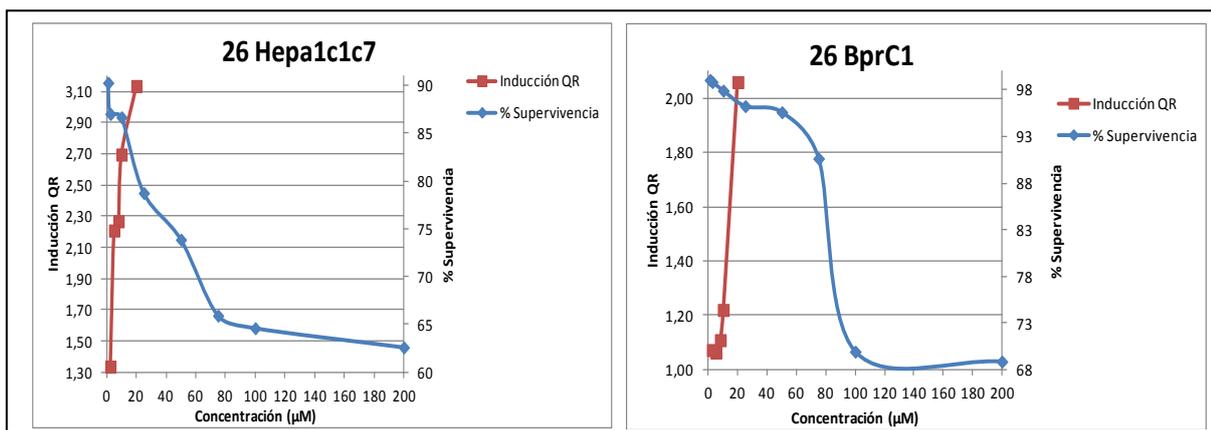
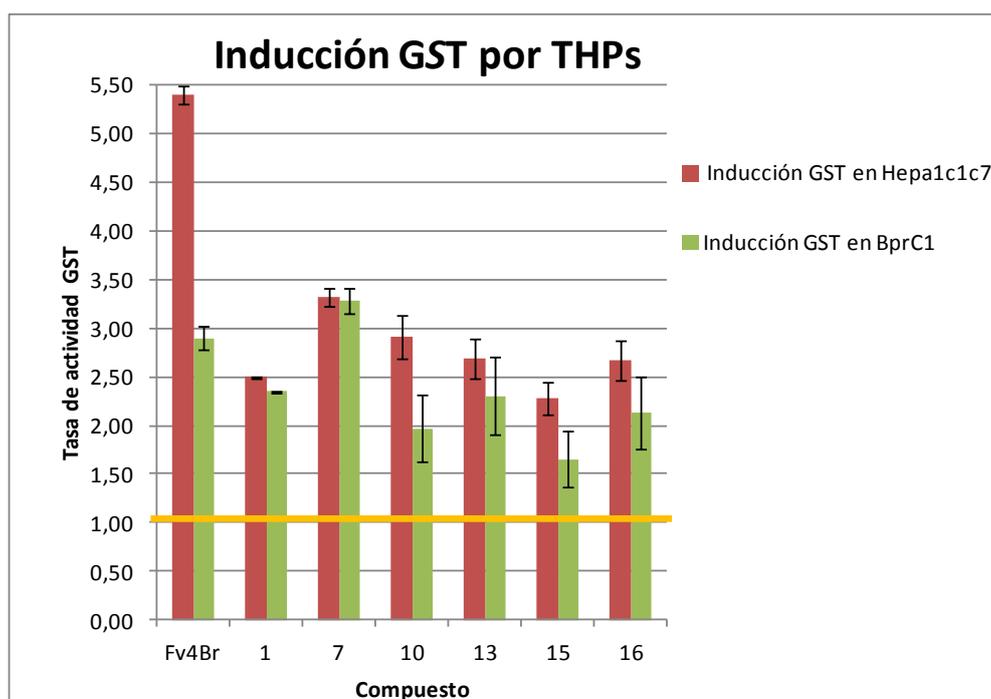


Figura 14. Curvas de dosis respuesta (en rojo) y de citotoxicidad (en azul) obtenidas para **18**. En ninguno de los casos se excede el 20% de DS.

En caso de **26** (Figura 14), el brusco decaimiento del porcentaje de supervivencia en Hepa1c1c7 muestra que el compuesto presentó una tendencia de mayor citotoxicidad en la cepa *wt*, en comparación con la mutante. Sin embargo, el compuesto no resultó ser potencialmente tóxico en las concentraciones evaluadas, para ninguna de las dos cepas, de hecho el porcentaje de supervivencia a la concentración más alta (200 µM) superó el 50% en ambas cepas, por lo que no fue posible determinar  $IC_{50}$  en el rango de concentraciones ensayadas. En ambos casos presentaron curva de dosis respuesta con tendencia de mayor actividad de QR a mayor concentración del producto, siendo **26** más inductor en Hepa1c1c7 que en BprC1.

## Inducción de GST por THPs y derivados

Se seleccionaron los THPs y derivados **1**, **7**, **10**, **13**, **15** y **16** (que presentaron el comportamiento deseado en la inducción de QR), para evaluar su capacidad de inducir GST como forma de verificar si se trata efectivamente de compuestos inductores de enzimas detoxificantes de fase II y si presentan un comportamiento de inducción monofuncional, como es de esperarse también para esta enzima. Para esto se realizó un ensayo a dosis fija 10  $\mu\text{M}$  y se cuantificó la actividad enzimática de GST según protocolo (ver sección Materiales y métodos).

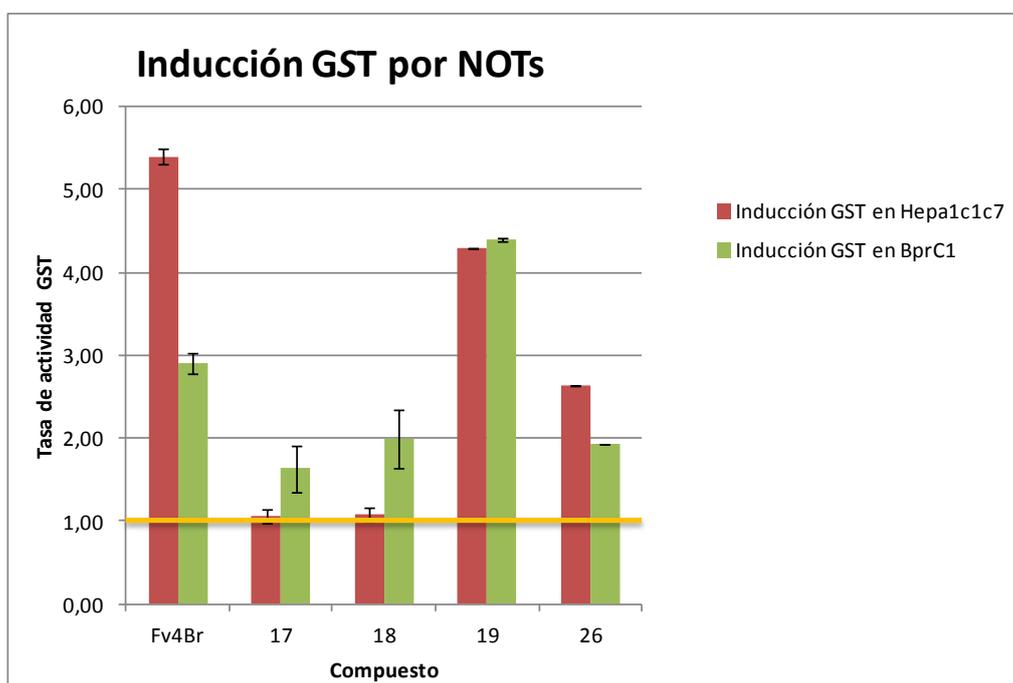


**Figura 15.** Gráfico de inducción de GST por parte de **3**, **10**, **11**, **13**, **15**, **16** y del control positivo Fv4Br en ensayo a dosis fija 10  $\mu\text{M}$ . Los resultados se expresan como tasa de actividad GST  $\pm$ DS.

Todos los compuestos resultaron ser inductores de GST en ambas cepas (**Figura 15**). Se destaca que la inducción de actividad enzimática fue mayor en GST que en QR a la misma dosis (10  $\mu\text{M}$ ) lo que sugiere que GST es más fácilmente inducible por estos compuestos que QR. El compuesto **1** fue un inductor potente en ambas cepas duplicando la tasa de actividad enzimática de GST a 10  $\mu\text{M}$ . Aún mejor es el caso de **7** que triplica la tasa de actividad enzimática de GST a la misma concentración por lo que resulta un inductor aún más potente. De los compuestos evaluados **13** y **16** son los que presentaron un comportamiento ideal, fueron buenos inductores de la enzima en ambas cepas y casi con la misma potencia. En caso de **10**, éste fue levemente más inductor en Hepa1c1c7 que en BprC1 pero tampoco se trata de un compuesto bifuncional ya que la diferencia no es significativa. Nuevamente los resultados sugieren que los compuestos son capaces de inducir la expresión de enzimas detoxificantes de fase II y que lo hacen en mayor o menor medida, con el comportamiento deseado.

## Inducción de GST por NOTs

Con el objetivo de afirmar los resultados obtenidos y evaluar si los compuestos en cuestión son efectivamente inductores de enzimas detoxificantes de fase II, se determinó la capacidad de inducción de GST por parte de aquellos NOTs que presentaron *in vitro* el comportamiento deseado en la inducción de QR.



**Figura 16.** Gráfico de la inducción de GST por parte de los compuestos 17, 18, 19 y 26 y del control positivo Fv4Br, obtenidos en un ensayo a modo de *screening* a dosis fija  $\mu\text{M}$ .

En la **Figura 16** se muestran los resultados obtenidos de inducción de GST por parte de diferentes NOTs (17, 18, 19 y 26) y del control positivo bifuncional (Fv4Br). Todos los compuestos fueron en mayor o menor medida inductores de GST y mostraron un comportamiento monofuncional. Para los casos de 17 y 18, los compuestos fueron poco inductores de GST en la cepa salvaje pero no así en la mutante, por lo que mostraron una tendencia a comportarse más bien como inductores especiales que no se observaba en el ensayo *in vitro* a modo de tamizaje a dosis fija de inducción de QR. Se destaca la inducción de actividad enzimática por parte de 19, como ocurría en QR, lo que afirma que el compuesto en cuestión es un buen inductor de enzimas detoxificantes de fase II y a la vez monofuncional. Cabe destacar que 26 también presenta valores de inducción de GST significativos en ambas cepas, por lo que también se trata de un compuesto con capacidad de inducción de actividad enzimática con tendencia a comportarse como monofuncional, si bien es algo más activo en Hepa1c1c7.

## Ensayos *in silico*

Si bien en Química Medicinal siempre se emplearon características estructurales de las moléculas para predecir su posible comportamiento como fármaco, éstas reglas fueron definidas por primera vez por *Lipinski* y colaboradores en el año 1997 y se conocen como “Reglas de Lipinski”.<sup>[33]</sup>

Estas reglas fueron creadas a partir de la clasificación fisicoquímica de distintos fármacos que sirven hoy en día para identificar si una estructura química determinada cumple con “propiedades de tipo fármaco”.

Estas reglas son:

- 1) No más de 5 dadores de enlaces de Hidrógeno (EDH) en la molécula
- 2) Peso molecular menor a 500
- 3) LogP <5 (o MlogP <4.15)
- 4) No más de 10 aceptores de EDH
- 5) Los transportadores de sustratos biológicos son excepción de la regla.

Las reglas se basan en propiedades fisicoquímicas importantes desde el punto de vista farmacológico. Por un lado, el incremento de los enlaces de Hidrógeno disminuye la partición del compuesto en la fase acuosa por lo que se verá afectado su transporte hacia el interior celular. A su vez, moléculas con elevado PM tendrán dificultad de atravesar la fina bicapa lipídica mediante difusión pasiva. El incremento en LogP (coeficiente de reparto octanol/agua) disminuye la solubilidad de un compuesto en agua, lo que por ende reduce la absorción del mismo. Por último, los transportadores de membrana pueden potenciar la absorción de un compuesto, activando mecanismos de transporte hacia el interior celular, o disminuirla mediante mecanismo de eflujo.

Por lo tanto, determinar estas propiedades resulta relevante para predecir si los compuestos en cuestión presentan características deseables desde el punto de vista farmacológico.<sup>[33]</sup>

Con el objetivo de predecir si los compuestos evaluados presentan características farmacológicamente deseables se determinaron parámetros *in silico* para todos los compuestos evaluados de forma de predecir efectos adversos y/o deseables de estas moléculas como posibles futuros fármacos. Estas “propiedades tipo fármaco” del inglés *Druglikeness* <sup>[34]</sup>son estimadas a partir de descriptores topológicos o a partir de otras propiedades como PM<sup>[35]</sup>, clogP<sup>[36]</sup>, entre otras. Se empleó la herramienta Osiris Property Explorer® que 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).<sup>[37]</sup> Valores positivos señalan que la molécula contiene los fragmentos que frecuentemente se encuentran en medicamentos comerciales. Basándose en el mismo principio, el software predice el riesgo de toxicidad de un compuesto (mutagenicidad, carcinogénesis y efectos

reproductivos) y puede asignar a cada estructura un *Drug-Score*<sup>[38]</sup> que combina las distintas propiedades y cuyos valores oscilan entre 0 y 1, siendo mejores los más cercanos a 1.

**Tabla 5.** "Propiedades tipo fármaco" (del inglés *druglikeness*) de los derivados THPs 1 a 26 predichas *in silico* mediante el uso del software *Osiris Property Explorer*®

| COMPUESTO | RIESGO DE TOXICIDAD |             |           | Efecto Reproductivo | <i>Druglikeness</i> | <i>Drug-Score</i> |
|-----------|---------------------|-------------|-----------|---------------------|---------------------|-------------------|
|           | Mutagénico          | Cancerígeno | Irritante |                     |                     |                   |
| 1         | (+)                 | (+)         | (+)       | (+)                 | -1,18               | 0,55              |
| 2         | (+)                 | (+)         | (+)       | (+)                 | -1,61               | 0,50              |
| 3         | (+)                 | (-)         | (+)       | (+)                 | -2,01               | 0,29              |
| 4         | (+)                 | (+)         | (+)       | (+)                 | -1,13               | 0,52              |
| 5         | (+)                 | (+)         | (+)       | (+)                 | -0,38               | 0,60              |
| 6         | (+)                 | (-)         | (+)       | (+)                 | -1,23               | 0,33              |
| 7         | (+)                 | (+)         | (+)       | (+)                 | -0,36               | 0,64              |
| 8         | (+)                 | (+)         | (+)       | (+)                 | -0,83               | 0,58              |
| 9         | (+)                 | (+)         | (+)       | (+)                 | -8,66               | 0,40              |
| 10        | (+)                 | (+)         | (+)       | (+)                 | -7,77               | 0,41              |
| 11        | (+)                 | (+)         | (+)       | (±)                 | -4,24               | 0,35              |
| 12        | (±)                 | (+)         | (±)       | (+)                 | -0,82               | 0,37              |
| 13        | (±)                 | (+)         | (±)       | (±)                 | -3,74               | 0,22              |
| 14        | (±)                 | (+)         | (+)       | (+)                 | -9,42               | 0,22              |
| 15        | (±)                 | (+)         | (±)       | (+)                 | -0,7                | 0,37              |
| 16        | (±)                 | (+)         | (±)       | (+)                 | -6,18               | 0,25              |

Clasificado de acuerdo a: (+) no efectos adverso, (±) efectos adversos medios, (-) efectos adversos.

Los resultados obtenidos muestran que las THPs 1, 2, 4, 5, 7, 8, 9 y 10 no presentarían riesgo de toxicidad para el usuario, por lo que podrían seguir siendo evaluados como candidatos a fármacos (Tabla 4). Los derivados 3 y 6 análogos entre sí resultaron ser cancerígenos, por lo que éste efecto adverso podría atribuirse a la presencia del agrupamiento dimetilamina en posición *para* del anillo de benceno, por ser éste el grupo funcional que ambas moléculas tienen en común y que las diferencia del resto de las THPs que no fueron carcinógenas *in silico*. Los compuestos 11-16 son THPs S-alquiladas y presentaron todas ellas efectos adversos medios, por lo que puede afirmarse que la S-alquilación de las THPs aumenta la toxicidad de las mismas, por lo tanto, desfavorece su comportamiento como posibles candidatos a fármaco. De las THPs ensayadas se destaca 7, ya que resultó ser el inductor monofuncional de QR más potente en Hepa1c1c7 y BprC1 *in vitro*, y además presentó el mayor valor de *Drug-Score*. Por lo tanto, correlacionando la capacidad de ésta de inducir QR *in vitro* y las características estructurales que lo vuelven un compuesto interesante desde el punto de vista farmacológico, el derivado 7 resulta una estructura atractiva para seguir siendo evaluada como posible fármaco. Sin embargo, lo opuesto ocurre con 16 que resultó ser uno de los mejores inductores *in vitro* pero presentó *in silico*, distintos efectos adversos (por lo tanto un bajo valor de *Drug-Score*). Esto demuestra la importancia de investigar los compuestos en cuestión a través de diferentes ensayos en etapas tempranas del desarrollo

como fármaco, ya que una misma estructura puede presentar características que cumplen con la actividad biológica buscada, pero a la vez no ser aptas para su uso como potencial fármaco.

**Tabla 5.** “Propiedades tipo fármaco” (del inglés *druglikeness*) de los derivados NOTs **17** a **27** predichas *in silico* mediante el uso del software *Osiris Property Explorer*®

| COMPUESTO | RIESGO DE TOXICIDAD |             |           | Efecto Reproductivo | <i>Druglikeness</i> | <i>Drug-Score</i> |
|-----------|---------------------|-------------|-----------|---------------------|---------------------|-------------------|
|           | Mutagénico          | Cancerígeno | Irritante |                     |                     |                   |
| <b>17</b> | (+)                 | (+)         | (+)       | (+)                 | -2,08               | 0,39              |
| <b>18</b> | (±)                 | (+)         | (+)       | (+)                 | -1,26               | 0,30              |
| <b>19</b> | (+)                 | (+)         | (+)       | (+)                 | -6,59               | 0,32              |
| <b>20</b> | (+)                 | (+)         | (+)       | (+)                 | -1,51               | 0,37              |
| <b>21</b> | (+)                 | (+)         | (+)       | (+)                 | -2,08               | 0,31              |
| <b>22</b> | (-)                 | (-)         | (+)       | (+)                 | -6,21               | 0,10              |
| <b>23</b> | (-)                 | (+)         | (+)       | (+)                 | -3,69               | 0,20              |
| <b>24</b> | (+)                 | (+)         | (+)       | (+)                 | -7,39               | 0,39              |
| <b>25</b> | (+)                 | (+)         | (+)       | (+)                 | -3,49               | 0,38              |
| <b>26</b> | (+)                 | (+)         | (+)       | (+)                 | -3,54               | 0,37              |
| <b>27</b> | (-)                 | (+)         | (+)       | (+)                 | -11,5               | 0,20              |

Clasificado de acuerdo a: (+) no efectos adverso, (±) efectos adversos medios, (-) efectos adversos.

En el caso de Los *N*-óxidos de triazinas **17**, **19**, **20**, **21**, **24**, **25** y **26** no presentarían riesgo de toxicidad, y presentan valores de *Drug-Score* intermedios y similares entre sí que van desde 0,31-0,39. Dentro de los *N*-óxidos de triazinas los derivados **18**, **22**, **23** y **27** mostraron *in silico* diferentes efectos de toxicidad (**Tabla 5**). La potencial toxicidad en el caso de **18** puede atribuirse a la presencia de cloro en posición *para* del anillo de benceno por ser éste el agrupamiento que lo diferencia de otros NOTs que no mostraron efectos adversos *in silico*. Nuevamente, como ocurría en las THPs, la presencia del agrupamiento dimetilamina se vincula con la toxicidad de las moléculas *in silico* (**22**). En caso de **23** y **27**, los efectos adversos mostrados por los mismos *in silico* podrían atribuirse a la presencia del grupo funcional nitro. En cambio, **24** también presenta un grupo nitro en su estructura y se diferencia de **27** solo por la presencia de morfolina y sin embargo no muestra efectos adversos *in silico*. Lo que sugiere que la presencia de la morfolina disminuye la toxicidad de la molécula o que la reducción del agrupamiento etenilo que conecta al sistema *N*-óxido de triazinas y el fenilo susitado promueve la baja toxicidad. Analizando los resultados de la **Tabla 5** se puede agrupar los NOTs ensayados en dos grandes clases según los valores de *Drug-Score* que presentan: 1) aquellos que presentan bajos valores, comprendidos en el rango 0,10-0,20 como consecuencia de la predicción de mutagenicidad (**22**, **23** y **27**) y 2) aquellos que presentan valores intermedios 0,30-0,39 (**17-21** y **24-26**). Este segundo grupo merece especial atención ya que los derivados más interesantes desde el punto de vista de actividad biológica deseada, los inductores monofuncionales **18**, **19** y **26** (**Tabla 3**) no presentan efectos adversos importantes y se

predijo valores intermedios de *Drug-Score* por lo que se hacen interesantes como posibles futuros fármacos. Mayores estudios son necesarios en este sentido.

### Determinación de la concentración que duplica la actividad enzimática (CD), concentración a la cual inhibe el 50% de las células (IC<sub>50</sub>) e índice de quimioprevención (IQ) de THPs

A partir de las curvas de dosis respuesta y de citotoxicidad, se determina la concentración a la cual el compuesto duplica la actividad enzimática de QR (CD) y la concentración a la cual inhibe el 50% de las células (IC<sub>50</sub>), respectivamente. A partir de los resultados de CD e IC<sub>50</sub> se procedió a determinar el Índice de quimioprevención (IQ). Este se determina para estimar que tan bueno es un compuesto como posible agente quimiopreventivo contra el cáncer, de modo que cuanto mayor sea este valor, mayor capacidad quimiopreventiva presenta el compuesto en cuestión.<sup>[39]</sup>

Lo deseable sería que el valor hallado de IC<sub>50</sub> sea elevado (baja toxicidad frente a las cepas ensayadas) y que CD sea bajo, es decir que a bajas concentraciones del compuesto se logre duplicar la actividad enzimática de QR. Comparando los índices de quimioprevención obtenidos para un mismo compuesto en ambas cepas, sería deseable que IQ en Hepa1c1c7 sea menor que en BprC1, nuevamente para lograr la selectividad buscada es decir que el compuesto sea mejor quimiopreventivo frente a la cepa que posee la Vía AhR-XRE truncada, por la cual no es deseable que se induzca actividad de enzimas detoxificantes de fase II.

**Tabla 6.** Valores de CD, IC<sub>50</sub> e Índice de quimioprevención (IQ) obtenidos para los compuestos **1**, **7**, **10**, **13**, **15** y **16**; para *t*-BHQ (inductor monofuncional) y FV4Br (inductor bifuncional).

| Compuesto     | CD (μM)   |       | IC <sub>50</sub> (μM) |       | Índice de quimioprevención (IQ) |       |
|---------------|-----------|-------|-----------------------|-------|---------------------------------|-------|
|               | Hepa1c1c7 | BprC1 | Hepa1c1c7             | BprC1 | Hepa1c1c7                       | BprC1 |
| <b>1</b>      | 2,8       | 14    | >200                  | >200  | >70                             | >14   |
| <b>7</b>      | 10        | 6,2   | >200                  | >200  | >20                             | >32   |
| <b>10</b>     | >20       | 11    | >200                  | >200  | ~10                             | >19   |
| <b>13</b>     | 9,9       | >20   | 133                   | 58,9  | 13                              | <3,0  |
| <b>15</b>     | 12        | 20    | 68,2                  | 122   | 5,7                             | 6,1   |
| <b>16</b>     | >20       | >20   | 67                    | 151   | <3,4                            | <7,6  |
| FV4Br         | 0,79      | >75   | 85                    | 150   | 107                             | <0,5  |
| <i>t</i> -BHQ | 1         | 6     | 147                   | 60    | 147                             | 10    |

A partir de los resultados obtenidos de CD e IC<sub>50</sub> para aquellos THPs y derivados que presentaron el comportamiento buscado (**1**, **7**, **10**, **13**, **15** y **16**) se determinó el Índice de Quimioprevención de los mismos. En caso del derivado **1**, el valor CD en Hepa1c1c7 es tres veces mayor al valor CD del control positivo bifuncional (Fv4Br), mientras que para BprC1 fue significativamente menor en comparación a este control positivo. Este resultado es relevante, ya que si bien Fv4Br es inductor bifuncional está ampliamente descrito como agente quimiopreventivo <sup>[22]</sup> y el compuesto presenta valores IQ mejores que este control. En cuanto a la citotoxicidad, el compuesto no resultó citotóxico en ninguna de las dos cepas. Estos resultados contribuyen a que el valor IQ obtenido sea mayor en Hepa1c1c7. Por lo que se puede concluir que es un muy buen inductor monofuncional de QR *in vitro*. El derivado **7** mostró valores de CD del orden de los obtenidos en el control positivo monofuncional (*t*-BHQ) y lo que es mejor aún es que la

actividad enzimática de QR se duplica a dosis menores en Hepa1c1c7 (10  $\mu$ M) que en BprC1 (6,2  $\mu$ M). El compuesto no resultó citotóxico para ninguna de las dos cepas y por lo tanto IQ fue mayor en BprC1 que en Hepa1c1c7. Siendo esta THP por tanto un destacado inductor monofuncional de QR *in vitro* en caso de **13**, el compuesto presenta un CD del orden del CD obtenido en el control positivo monofuncional (*t*-BHQ) pero en caso de BprC1 no pudo determinarse CD en el rango de concentraciones evaluadas. Si se observan los valores de IC<sub>50</sub>, claramente el compuesto fue más tóxico en la cepa mutante por lo que IQ es significativamente mayor en Hepa1c1c7 que en BprC1. Estos resultados contribuyen a que IQ para BprC1 sea bajo, lo que se aleja del comportamiento deseado. En caso de **15**, los valores de CD obtenidos en ambas cepas son significativamente mayor si se comparan con *t*-BHQ, lo que sugiere que se necesitan concentraciones mayores del compuesto en cuestión para lograr el mismo efecto. En cuanto a la citotoxicidad, en oposición a lo que ocurre en *t*-BHQ, el compuesto resultó ser más citotóxico en la cepa salvaje en comparación de la mutante. Este resultado contribuye a que IQ sea mayor en BprC1 que en Hepa1c1c7 lo que concuerda con el comportamiento buscado, inductor monofuncional. Para el caso de **16**, no se observaron diferencias en cuanto a la inducción de QR ya que no pudo determinarse CD en el rango de concentraciones evaluadas, pero al igual que **15**, el compuesto fue más citotóxico en la cepa salvaje lo que contribuye a que IQ sea mayor en la cepa mutante. El hecho de que IQ sea mayor en la cepa mutante para **15** y **16** no significa que presenten el comportamiento deseado ya que ésta diferencia se debe a la citotoxicidad y no a la capacidad de inducción de QR por parte de los compuestos. Los THPs **7**, **10** y **15** en menor medida fueron los compuestos que presentaron el comportamiento más cercano al ideal con IQ en BprC1 con valores superiores a los de los reconocidos agentes inductores usados como referencias positivas.

### Determinación de la concentración que duplica la actividad enzimática (CD), concentración a la cual inhibe el 50% de las células (IC<sub>50</sub>) e índice de quimioprevención (IQ) de NOTs

**Tabla 7.** Valores de CD, IC<sub>50</sub> e Índice de quimioprevención (IQ) obtenidos para los compuestos **17**, **18**, **19** y **26**; para *t*BHQ(inductor monofuncional) y FV4Br (inductor bifuncional).

| Compuesto    | CD(μM)    |       | IC <sub>50</sub> (μM) |       | Índice de quimioprevención (IQ) |       |
|--------------|-----------|-------|-----------------------|-------|---------------------------------|-------|
|              | Hepa1c1c7 | BprC1 | Hepa1c1c7             | BprC1 | Hepa1c1c7                       | BprC1 |
| <b>17</b>    | 18        | 20    | 136                   | 83    | 8,0                             | 4,2   |
| <b>18</b>    | 20        | >20   | 4,0                   | <1    | 0,2                             | ---   |
| <b>19</b>    | 7,5       | 5,0   | 2,0                   | 108   | 0,3                             | 22    |
| <b>26</b>    | 4,4       | 14    | >200                  | >200  | >46                             | >14   |
| FV4Br        | 0,79      | >75   | 85                    | 150   | 107                             | <0,5  |
| <i>t</i> BHQ | 1         | 6     | 147                   | 60    | 147                             | 10    |

Se determinó CD, IC<sub>50</sub> e IQ para aquellos derivados de *N*-óxidos de triazinas que resultaron exitosos en la inducción de QR en tamizaje a dosis fija a 10 μM (ver **Tabla 7**). Como referencia se muestran los CD, IC<sub>50</sub> e IQ del inductor bifuncional 4-Bromo Flavona (FV4Br) y del inductor monofuncional tert-butilhidroquinona (*t*-BHQ).

En caso del derivado **17** si se comparan los valores de CD obtenidos para éste con los del control positivo monofuncional (*t*-BHQ) claramente se necesitan dosis mayores del compuesto para lograr el mismo efecto, pero no se observan diferencias significativas en cuanto a la citotoxicidad. Estos resultados contribuyen a que IQ sea mayor en Hepa1c1c7 que en BprC1. Aún así, **17** continúa siendo un compuesto interesante ya que si se comparan estos valores con los IQ obtenidos para *t*-BHQ, las diferencias entre los valores de IQ para las cepas salvaje y mutante (8,0 y 4,2, respectivamente) no son significativas como ocurre en el control positivo monofuncional (147 y 10, respectivamente).

El derivado **18** presenta un bajo índice de quimioprevención en Hepa1c1c7, en comparación al control positivo *t*-BHQ, debido a la alta concentración necesaria para duplicar la actividad enzimática de QR y a la alta toxicidad mostrada por el compuesto en esa cepa. En caso de BprC1, no pudo determinarse el índice de quimioprevención debido a que no se logró duplicar la actividad enzimática en las concentraciones ensayadas y la toxicidad es muy elevada. Estos resultados reflejan lo antes mencionado de que el compuesto presenta una ventana terapéutica pequeña, por lo que se observan efectos no deseados con leves cambios en la concentración. Estos resultados reflejan que el compuesto **18** no reúne características atractivas como potencial agente quimiopreventivo para el cáncer a través de este mecanismo.

El derivado **19** presenta varias características que lo vuelven interesante como posible agente quimiopreventivo contra el cáncer. En primer lugar, los valores de CD obtenidos en ambas cepas son del orden de los obtenidos en el control positivo *t*-BHQ. Lo que es aún mejor es que la concentración necesaria para inducir actividad enzimática de QR en BprC1 es menor que la necesaria de *t*-BHQ para

lograr el mismo efecto. Por otro lado, el compuesto resultó ser potencialmente citotóxico en Hepa1c1c7 pero no así en BprC1. Estos resultados contribuyen a que el índice de quimioprevención sea mayor en BprC1 que en Hepa1c1c7 notoriamente (73 veces mayor). Por lo tanto, parece ser un compuesto que presenta selectividad frente a la cepa BprC1 y por lo tanto un potencial agente como quimiopreventivo.

En caso del derivado **26**, los valores CD no difieren significativamente de los valores CD de *t*-BHQ. A los efectos de evaluar la citotoxicidad, no se pudo determinar en ninguno de los dos casos  $IC_{50}$  por lo que el compuesto no resultó citotóxico en las concentraciones evaluadas, en oposición a lo que ocurre con el control positivo monofuncional, lo que favorece las características del compuesto. El valor IQ fue mayor en la cepa salvaje que en la mutante debido a que CD es menor en la primera. Estos resultados sugieren que esta NOT sea considerado un potencial agente quimiopreventivo dado que los valores CD son bajos y presenta excelentes valores de IQ.

## Materiales y métodos

---

## PARTE EXPERIMENTAL BIOLÓGICA

### Crecimiento celular

Para el crecimiento de las líneas celulares se empleó, en caso de Hepa1c1c7 medio *Alpha Minimum Essential Medium* ( $\alpha$ -MEM) sin nucleósidos y para BprC1 *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM).<sup>[40]</sup> Ambos medios se suplementaron con suero fetal bovino (SFB) al 10% v/v, 100 U/mL de Penicilina y 100  $\mu$ g/mL de Estreptomina. Las células crecieron en botellas 25-75 cm<sup>2</sup> en una atmósfera aerobia (95%), 5% de Dióxido de Carbono (CO<sub>2</sub>) y 37°C de temperatura. Las células crecen adheridas a la superficie por lo que para el pasaje de las mismas se empleó una solución Tripsina-EDTA 1x capaz de separar la monocapa de la superficie. Para el procedimiento se quita el medio de cultivo empleando una bomba de vacío, se lava con PBS (sin Ca ni Mg) y se retira el mismo. Posteriormente se adiciona Tripsina-EDTA y se deja 5 minutos en estufa de cultivo a 37°C. Por último, se adiciona medio de cultivo y se transfiere el volumen adecuado a una nueva botella. Para descomplementar el SFB se deja en un baño con agitación a 50 $\pm$ 2°C durante 30 minutos.

### Criopreservación

Una vez que las células alcanzan la fase de crecimiento exponencial, se procede al congelamiento de las mismas. Se *tripsinizan* como se describió anteriormente y se realiza el recuento celular. Posteriormente se centrifuga a 200 g durante 5 minutos, se descarta el sobrenadante y el pellet se suspende en medio crioprotector.<sup>[41]</sup> Éste medio está compuesto por 10% v/v de SFB y 1% de DMSO. Las células se trasvasan entre 1-1.5 mL a criotubos y se mantienen las células en cámara de congelamiento a -80 °C. Una vez que se necesite descongelar un criotubo, se suspende el volumen del mismo en 10 mL de medio de cultivo y se centrifuga a 200 g durante 5 minutos. Luego se descarta el sobrenadante, se resuspende el pellet en 5 mL de medio fresco y se trasvasa a botellas 25-75 cm<sup>2</sup>.

### Recuento celular

Para realizar el recuento celular se emplea una cámara de Neubauer. Se adicionan 10  $\mu$ L de la suspensión celular y se agrega *Trypan-blue*, que es un colorante que ingresa a las células cuando éstas presentan disrupción en la membrana, es decir cuando están inviables.<sup>[42]</sup> <sup>[43]</sup> Así se evalúa que porcentaje celular se encuentra viable y que porcentaje no lo está, para promediar cuantas se encuentran viables.

### Ensayo *in vitro* de actividad enzimática

Para realizar el ensayo de actividad enzimática se procede al recuento celular y luego se siembran a razón de 100.000 células por pocillo en placas de 24 con fondo plano.<sup>[44]</sup> Se completa el volumen sembrado con medio fresco hasta alcanzar 1 mL y se deja en estufa de cultivo a 37°C. A las 24 hrs se retira el medio y se adiciona medio fresco y se incuba nuevamente. A las 24 hrs siguientes se quita el medio y se agrega diluciones adecuadas de los compuestos y una dilución de DMSO menor al 1% para el control negativo. Nuevamente se completa con medio fresco hasta llegar a 1 mL y se dejan tratando durante 48 hrs en estufa de cultivo a 37°C. Una vez cumplidas las 48 h. se retira el medio de cultivo, se *tripsiniza* con 100 µL de Tripsina-EDTA y se deja 5 min en estufa de cultivo a 37°C. Luego se adicionan 900 µL de medio fresco y se transfiere el contenido a tubos Eppendorf previamente rotulados. Se procede a centrifugar a 10.000 g durante 5 min y se retira el sobrenadante. El pellet se suspende con 1 mL de PBS (sin Ca ni Mg) y se centrifuga en las mismas condiciones antes descritas. Se retira el sobrenadante y se suspende el pellet en 500 µL de buffer Tris-HCl pH 7.4 y se procede a lisar las células. Para ello, se emplea un sonicador de vástago a 4°C, 40 % de amplitud durante 15 s. Por último se centrifuga nuevamente a 10.000 g durante 5 minutos y se transfiere el sobrenadante (conteniendo la fracción citosólica) a tubos Eppendorf previamente rotulados y se mantienen las muestras a -20°C hasta su posterior uso.

### Determinación de la actividad enzimática

Para la determinación de actividad enzimática se empleó un espectrofotómetro Cary Win UV que dispone del software *Kinetics* que permite realizar cinética enzimática. Se fijan parámetros como longitud de onda, Y máximo entre otros, según corresponda. El software predice el valor de la pendiente que corresponde a Absorbancia/tiempo, con el cual mediante ley de Lambert Beer <sup>[45]</sup> se procede a determinar actividad enzimática.

### Actividad enzimática de QR

La actividad enzimática de QR se siguió por absorbancia a 600 nm,<sup>[46] [47]</sup> empleando una solución Tris-HCl amortiguadora, pH 7.4, con NADH como dador de electrones y DCPIP como sustrato. El DCPIP, tiene su máximo de absorbancia a 600 nm, es de color azul en su estado oxidado pasando a incoloro cuando se reduce. En la reacción catalizada por la enzima (reducción de dos electrones de quinonas a hidroquinonas), el sustrato se reduce, de modo que la cantidad de sustrato reducido se verá incrementada concomitantemente con la actividad enzimática. Se sigue el decremento en la absorbancia a 600 nm durante 1 min y se calcula la actividad específica de la enzima. Las medidas se efectúan por triplicado.

### Actividad enzimática de GST

La actividad enzimática de GST se siguió por absorbancia a 340 nm. En este caso se empleó una solución amortiguadora, pH 6.5, preparada a partir de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  y  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  que contenía, además 1-Cloro-2,4-dinitrobenzoceno (CDNB) y Glutati6n reducido (GSH).<sup>[46]</sup> GST transfiere GSH a la mol6cula de CDNB, formando un complejo GS-CDNB que absorbe a 340 nm. Se sigue el aumento de la absorbancia a 340 nm y se calcula la actividad especifca de la enzima. Las medidas se efectúan por triplicado y se realiza una correcci6n por actividad espontánea en ausencia de enzima.

Tanto para QR como para GST se determinó la tasa de actividad, es decir:

$$\text{Tasa de actividad} = \frac{\text{Actividad células tratadas}}{\text{Actividad células sin tratamiento}}$$

Siendo *Actividad células tratadas*, la actividad enzimática correspondiente a las células tratadas con el producto a la dosis correspondiente y *Actividad células sin tratamiento* (control negativo) la actividad enzimática en las células previamente incubadas con el disolvente utilizado en la diluciones de los compuestos (DMSO). En todos los casos se incubaron las células durante 48 hrs y se realizaron ensayos a modo de *screening* primario a dosis fija de los compuestos 10  $\mu\text{M}$ .

### Cuantificaci6n de prote6na

Para la determinaci6n de la cantidad de prote6na se empleo el m6todo del ácido bicincon6nico (BCA). En este ensayo se mide la formaci6n de  $\text{Cu}^+$  a partir de  $\text{Cu}^{2+}$ , en soluci6n alcalina de la prote6na, empleando BCA <sup>[48]</sup>. El átomo de  $\text{Cu}^{2+}$  proviene de una soluci6n de sulfato cúprico que se aña de al BCA, en una relaci6n 1:9, respectivamente. Aqu6 tienen lugar dos reacciones que involucran el átomo de cobre. La primera de estas ocurre a bajas temperaturas y es el resultado de la interacci6n del cobre y el BCA con residuos de tript6fano, ciste6na y tirosina de las prote6nas. A temperaturas elevadas, la reacci6n con el enlace pept6dico es responsable del desarrollo de color. Incubando a 37°C se logra incrementar la sensibilidad y disminuir las variaciones en la respuesta. El ácido bicincon6nico forma un complejo con el cobre que absorbe fuertemente a 562 nm <sup>[49]</sup>, por lo que determinar la absorbancia a esa longitud de onda es directamente proporcional a la cantidad de prote6na que hay en la muestra. Para esto debe realizarse una curva de calibraci6n con concentraciones conocidas de una prote6na estándar, como Suero Albúmina Bovina, más conocida como BSA por sus siglas en inglés *Bovine Serum Albumin*. De esta manera, conociendo la absorbancia de las muestras puede determinarse la concentraci6n de prote6na en las mismas. Las muestras se siembran en placa de 96 pocillos con fondo plano y la lectura de la placa se realiza en el equipo Varioskan Flash empleando la opci6n *photometric measurement* a 562 nm.

## Ensayo de Citotoxicidad

Para determinar la citotoxicidad de los compuestos frente a las líneas celulares empleadas se utilizó el método descrito por Skehan y colaboradores. [50] Las células se utilizan en su fase exponencial de crecimiento y se procede a sembrar al menos 60.000 células por pocillo, en placa de 96 pocillos con fondo plano, dejando una columna de pocillos sin sembrar para emplearla como blanco del ensayo. A las 24 hrs se agregan 125 µL de medio fresco y se deja 24 hrs. más. Al día siguiente se agrega volumen adecuado según la concentración que se desee evaluar del producto y se deja incubando durante 48 hrs. Una vez pasado este tiempo se procede a descartar el medio, lavar con 200 µL de PBS. En cámara de frío a 4°C se agregan 50 µL de TCA (50% v/v) y 200 µL de medio fresco para fijar las células a la placa y se deja allí entre 30-45 minutos. Posteriormente se descarta el TCA, se lava con agua Mili Q varias veces y se escurre bien la placa hasta que desaparezcan totalmente las gotas de agua. Para la tinción se empleó el método de Sulforrodamina B (SRB) [44] [50], en el cual se adicionan 50 µL de SRB 0,057 p/v en ácido acético 1% v/v y se deja 30 min. Se elimina la SRB lavando con 200 µL por pocillo de ácido acético 1% v/v y se dejan escurriendo las placas hacia abajo durante toda la noche. Posteriormente se realiza la lectura de la placa, en un lector de placas Varioskan Flash empleando la opción *photometric measurement* a longitud de onda de 540 nm.

Para la determinación del grado de toxicidad de los compuestos frente a las líneas celulares empleadas se procedió a la determinación de la concentración inhibitoria del 50 % (IC<sub>50</sub>). Dicho de otra manera, IC<sub>50</sub> es la concentración a la cual el compuesto en cuestión mata el 50 % de las células. Se evaluaron los compuestos a 200, 100, 75, 50, 25, 10, 2,5 y 1 µM y se determinó el porcentaje de supervivencia [46] de las células de la siguiente manera:

$$\% \text{ Supervivencia} = \frac{(\text{Abs problema} - \text{Abs blanco})}{(\text{Abs C(-)} - \text{Abs blanco})} \times 100$$

A partir de los valores obtenidos se grafica % Supervivencia vs. Concentración y se determina la concentración del compuesto a la cual el % Supervivencia celular equivale al 50% (IC<sub>50</sub>).

## Determinación de IQ

Una vez obtenidos CD e IC<sub>50</sub> de aquellos compuestos que resulten relevantes en la inducción de QR, se procede a determinar el índice de quimiopreención de los mismos. Éste se determina de la siguiente manera: [39]

$$\text{Índice de quimiopreención (IQ)} = \frac{IC_{50}}{CD}$$

## ESTUDIO DE PROPIEDADES MOLECULARES

### *Ensayo in silico*

Como ya se mencionó <sup>[35]</sup>, para la determinación de parámetros moleculares se empleó la herramienta Osiris Property Explorer®. Es un software que permite determinar 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).

## Conclusiones y Perspectiva

---

## Conclusiones y perspectiva

- ❖ Los derivados de THPs fueron en su mayoría inductores de QR en ambas cepas, a excepción del derivado **14**.
- ❖ Los que presentaron el comportamiento deseado fueron los derivados **1, 7, 10, 11, 13, 15 y 16**, siendo **13** el inductor más potente y **11** el más débil.
- ❖ Se observó *in vitro* que aquellos derivados que presentan carbonilo son mejores inductores que sus análogos con tiocarbonilo.
- ❖ A excepción de **13 y 14**, existe una tendencia en que la S-alquilación mejora el comportamiento deseado.
- ❖ Los derivados **1, 7, 10, 13, 15 y 16** que fueron buenos inductores de QR, resultaron ser inductores aún más potentes de GST.
- ❖ Los derivados **10 y 15**, fueron los que presentaron mejores valores de IQ siendo estos mayores en la cepa mutante que en la salvaje por lo que resultan interesantes para seguir siendo evaluados como posibles agentes quimiopreventivos.
- ❖ Los derivados de NOTs **17, 18, 19, 23, 24, 26** fueron inductores de QR en ambas cepas.
- ❖ Entre los NOTs evaluados, aquellos que presentaron el comportamiento deseado fueron **17, 18, 19 y 26**, siendo **19** el inductor más potente con tasas de inducción entorno a 4 en ambas cepas.
- ❖ La triazina más sencilla de los evaluados, 5,6-dimetil- N<sup>4</sup>-óxido-1,2,4 triazina- (**26**) resultó ser de los más destacados, lo que nos habla de la importancia del heterociclo NOT en modular la actividad deseada.
- ❖ Los derivados **17, 18, 19 y 26** que presentaron comportamiento cercano al esperado en cuanto a la inducción de QR, fueron también buenos inductores de GST.
- ❖ El derivado **19** fue el que presentó mejor valor IQ, siendo éste significativamente mayor en BprC1, por lo que resulta relevante para seguir siendo evaluado como posible agente quimiopreventivo contra el cáncer.

- ❖ La presencia del agrupamiento dimetiamina se correlaciona con efectos adversos no deseados, como ser cancerígenos, tanto para los derivados de THPs como para los NOTs, según los estudios *in silico* realizados.
- ❖ La S-alquilación del tiocarbonilo de las THPs disminuye las características deseables de un fármaco ya que se observan efectos adversos no deseados por parte de los derivados que presentan ésta característica, de acuerdo a los estudios *in silico*.
- ❖ La presencia del grupo nitro como sustituyente se relaciona con el efecto mutagénico *in silico* para algunos de los derivados como son **23** y **27**.
- ❖ Como perspectiva, sería interesante evaluar si además de su comportamiento como posibles quimiopreventivos contra el cáncer, los compuestos más prometedores presentan actividad como quimioterapéuticos evaluando su toxicidad en cepas tumorales.
- ❖ Además sería relevante confirmar que la activación de enzimas detoxificantes se da efectivamente por Vía Nrf2-ARE mediante inmunocitoquímica, marcando el Nrf2 y visualizando su translocación al núcleo.
- ❖ Por último se plantea como perspectiva correlacionar la inducción selectiva de enzimas de fase II por la vía Nrf2-ARE y la capacidad quimiopreventiva a través un modelo de cancerogénesis inducida químicamente *in vivo*.

## Bibliografía

---

- [1] OMS Cáncer disponible en internet <http://www.who.int>. Fecha de acceso 17/10/2012
- [2] **Barrios, E.; Ronco, A.; Fierro, L.; De Stéfani, E.; Vassallo, J.** Tendencias de la mortalidad por cáncer en Uruguay 1953-1997. *Rev. Med. Uruguay.* **2002**, 18: 167-174.
- [3] **PVE; RNC**, Informe 2010 síntesis de los últimos datos estadísticos, **2010**, 1-8 disponible en la web: <http://www.urucan.org.uy>. Fecha de acceso 15/11/2012
- [4] **Barrios, E.; Vassallo, J.; Alonso, R.; Garau, M.; Musetti, C.** III atlas de incidencia de cáncer en el Uruguay 2002-2006. Editorial Polo S.A., 1ra. Edición. Montevideo, Uruguay. **2010**, pág. 9-10, 14-15, 56-57.
- [5] **Alberts, B.; Johnson, A.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Walter, P.; Wilson, J.; Hunt, T.** Molecular Biology of THE CELL. Editorial Garland Science, 5ta. Edición. New York, USA. **2008**, pág. 1205-1207.
- [6] **Rubin, P.; Olaeta, R.; Curín, M.** Oncología clínica. Editorial Elsevier, 8va. Edición. Madrid, España. **2003**, pág 32.
- [7] **Voet, D.; Voet, J.** Bioquímica. Editorial Médica Panamericana, 3ra Edición. Buenos Aires, Argentina. **2006**, pág 713.
- [8] **Pool-Zobel, B.; Veeriah, S.; Böhmer, F.** Modulation of xenobiotic metabolising enzymes by anticarcinogens – focus on glutathione S-transferases and their role as targets of dietary chemoprevention in colorectal carcinogenesis. *Mutat. Res.* **2005**, 591: 74-92.
- [9] **Jeong-Sang, L.; Young-Joon, S.** Nrf2 as a novel molecular target for chemoprevention. *Cancer Lett.* **2005**, 224: 171-184.
- [10] **Zhao, C. R.; Gao, Z. H.; Qu, X. J.** Nrf2-ARE signaling pathway and natural products for cancer chemoprevention. *Cancer Epidem.* **2010**, 34: 523-533.
- [11] **Kwak, M.; Kensler, T. W.** Targeting Nrf2 signaling for cancer chemoprevention. *Toxicol. Appl. Pharm.* **2010**, 244: 66-76.
- [12] **Kwak, M.; Wakabayashi, N.; Kensler, T. W.** Chemoprevention through the Keap1-Nrf2 signaling pathway by phase 2 enzymes inducers. *Mutat. Res.* **2004**, 555: 133-148.
- [13] **Smith, M. T.; Wang, Y.; Kane, E.; Rollinson, S.; Wiemels, J.L.; Roman, E.; Roddam, P.; Cartwright, R.; Morgan, G.** Low NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 activity is associated with increased risk of acute leukemia in adults. *Blood.* **2001**, 97: 1422–1426.

- [14] **Smith, M. T.; Wang, Y.; Skibola, C.F.; Slater, D. J.; Lo Nigro, L.; Nowell, P. C.; Lange, B. J.; Felix, C. A.** Low NAD(P)H:quinone oxidoreductase activity is associated with increased risk of leukemia with MLL translocations in infants and children. *Blood*. **2002**, 100: 4590–4593.
- [15] **Benhamou, S.; Lee, W. J.; Alexandrie, A. K.; Boffetta, P.; Bochardy, C.; Butkiewicz, D.** Meta- and pooled analyses of the effects of glutathione S-transferase M1 polymorphisms and smoking on lung cancer risk. *Carcinogenesis*. **2002**, 23: 1343–50.
- [16] **Wang, W.; Jaiswal, A. K.** Nuclear factor Nrf2 and antioxidant responses element regulate NRH: quinone oxidoreductase 2 (NQO2) gene expression and antioxidant induction. *Free Radical Bio. Med.* **2005**, 40: 1119-1130.
- [17] **Klaassen, D. C.; Casarett, J. L.** Toxicology the basic science of poisons. Editorial McGraw-Hill, 5ta Edición. New York, USA, **2001**, pág160.
- [18] **Köhle, C.; Bock, K. W.** Coordinate regulation of Phase I and II xenobiotic metabolisms by the Ah receptor and Nrf2. *Biochem. Pharmacol.* **2007**, 73: 1853-1862.
- [19] **Tan, X.; Spivack, S. D.** Dietary chemoprevention strategies for induction of phase II xenobiotic enzymes in lung carcinogenesis: A review. *Lung Cancer*. **2009**, 65: 129-137.
- [20] **Laso, N.; Mas, S.; Lafuente, M. J.; Llobet, J. M.; Molina, R.; Ballesta, A.; Kensler, T. W.; Lafuent, A.** Capacidad de inducción metabólica de las verduras más consumidas habitualmente. *Alim. Nutri. Salud*. **2002**, 9:91-95.
- [21] **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.
- [22] **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.
- [23] **Köhle, C.; Bock, K. W.** Activation of coupled Ah receptor and Nrf2 gene batteries by dietary phytochemicals in relation to chemoprevention. *Biochem. Pharmacol.* **2006**, 72: 795-805.
- [24] **Königsberg Fainstein, M.** Nrf2: La historia de un nuevo factor de transcripción que responde a estrés oxidativo. *Reb.* **2007**, 26 (1): 18-25.
- [25] **Cabrera, M.; de Ovalle, S.; Canto, R.; Vianna, D.; Von Poser, G.; Russowsky, D.; Eifler-Lima, V.L.; Cerecetto, H.; González M.** Screening of different chemotypes looking for new monofunctional inducers

of phase II enzymes with potential cancer-chemoprevention activity. 5<sup>th</sup> Brazilian Symposium on *Medicinal Chemistry*, Ouro Preto Brasil. **2010**.

[26] **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.

[27] **Thanigaimalai, P.; Lee, K.C.; Bang, S.C.; Lee, J.H.; Yun, C.Y.; Roh, E.; Hwang, B.Y.; Kim Y, Jung, S.H.** Inhibitory effect of novel tetrahydropyrimidine-2(1H)-thiones on melanogenesis. *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, 18: 1135-1142.

[28] **Huang, Y. L.; Lin, C.F.; Lee Y.J.; Li, W.W.; Chao, T.C.; Bacherikov, V.A.; Chen, K.T.; Chen, C.M.; Su, T.L.** Non-classical antifolates, 5-(N-phenylpyrrolidin-3-yl)-2,4,6-triaminopyrimidines and 2,4-diamino-6(5H)-oxopyrimidines, synthesis and antitumor studies. *Bioorg. Med. Chem.* **2003**, 11: 145-157.

[29] **Russowsky, D.; Canto, R.F.; Sanches, S.A.; D'Oca, M.G.; de Fatima, A.; Pilli, R.A.; Kohn, L.K.; Antonio, 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.

[30] **Cerectto, H.; González, M.; Onetto, S.; Saenz, P.; Ezpeleta, O.; López de Ceráin, A.; Monge, A.** 1,2,4-Triazine *N*-oxide derivatives: studies as potential hypoxic cytotoxins. Part II. *Pharm. Med. Chem.* **2004**, 337: 247-258.

[31] **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.

[32] **Cabrera, M.** Flavonoides y análogos como moduladores de enzimas detoxificantes de xenobióticos. Potenciales agentes quimiopreventivos para el cáncer. *Tesis Doctorado en Química*, Facultad de Química, UdelaR. Montevideo, Uruguay. **2012**, pág. 126.

[33] **Kerns, E.; Di, L.** Drug-Like properties: Concepts, Structure, Design and Methods, from ADME to toxicity optimization. Editorial Elsevier, 1ra Edición. California, USA. **2008**, Pág. 37-38.

- [34] <http://www.organic-chemistry.org/prog/peo/druglikeness.html>. Fecha de acceso 22/11/2012.
- [35] <http://www.organic-chemistry.org/prog/peo/mw.html>. Fecha de acceso 22/11/2012.
- [36] <http://www.organic-chemistry.org/prog/peo/cLogP.html>. Fecha de acceso 22/11/2012.
- [37] *Osiris Property Explorer*, Actelion Pharmaceuticals Ltd., Gewerbstrasse 16, 4123 Allschwil, Suiza, <http://www.organicchemistry.org/>. Fecha de acceso 22/11/2012.
- [38] <http://www.organic-chemistry.org/prog/peo/drugScore.html>. Fecha de acceso 22/11/2012.
- [39] **Hagos, G. K.; Abdul-Hay, S. O; Sohn, J.; Edirisinghe, P.D. Chandrasena, R. E. P.; Wang, Z.; Li, Q.; Thatcher, G. R. J.** Anti-Inflammatory, Antiproliferative, and Cytoprotective Activity of NO Chimera Nitrates of Use in Cancer Chemoprevention. *Mol. Pharmacol.* **2008**, 74: 1381-1391.
- [40] <http://www.atcc.org>. Fecha de acceso 15/10/2012.
- [41] **L. Cheng; L.E. Wang; M.R. Spitz; Q. W.** Cryopreserving whole blood for functional assays using viable lymphocytes in molecular epidemiology studies. *Cancer Lett.* **2001**, 166: 155-163.
- [42] **Louis, K. S.; Siegel A. C.** Cell viability analysis using trypan blue: manual and automated methods. *Methods Mol.* **2011**, 740: 7-12.
- [43] **Strober, W.** Trypan blue exclusion test of cell viability. *Curr. Protoc. Immunol.* **1997**, 21: A.3.B.1-A.3.B.2.
- [44] **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.
- [45] **Koolman, J.; Röhm, K.** Bioquímica, texto y atlas. Editorial Médica panamericana, 3ra. Edición. Madrid, España. **2004**, pág. 102-103.
- [46] **Escobar, L.; Alfonso, P.; Aristizábal F.** Valoración de dos métodos de tinción en ensayos de citotoxicidad sobre líneas celulares tumorales. *Rev. Colomb. Biotecnol.* **2009**, 11: 49-56.
- [47] **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.
- [48] Bicinchoninic Acid Protein Assay Kit. *Technical Bulletin*, Sigma. Saint Louis, USA.
- [49] **Olson, B.; Markwell, J.** Assays for Determination of Protein Concentration. *Curr. Protoc. Protein Sci.* **2007**, (4)1-29.

<sup>[50]</sup> Skehan, P.; Storeng, R.; Scudiero, D.; Monks, A.; McMahon, J.; Vistica, D.; Warren, J. T.; Bokesch, Heidi; Kenney, S.; Boyd, M. R. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J. Nat. Cancer Inst.* **1990**, 82: 1107-1112.