

2013

Grupo de Química Medicinal, Laboratorio
de Química Orgánica, Facultad de Ciencias-
Facultad de Química



UNIVERSIDAD
DE LA REPUBLICA
URUGUAY

Diseño, síntesis y evaluación biológica de compuestos híbridos ditioltion- flavonoide como potenciales agentes inductores de Quinona reductasa y Glutación *S*-transferasa en quimioprevención del cáncer

Tesina de Grado en Licenciatura en Bioquímica
Marcos Couto

Tutores: Dr. Mauricio Cabrera; Dr. Hugo Cerecetto

Índice

Resumen	4
Abreviaturas	5
1. Introducción	6
1.1. Aspectos generales del cáncer	7
1.2. Principios generales de la carcinogénesis	9
1.3. Quimioprevención del cáncer	12
1.4. Modulación de enzimas metabolizadoras de xenobióticos como mecanismo quimiopreventivo para el cáncer	14
1.4.1 Enzimas de fase I y II	14
1.4.2 Generalidades del mecanismo de acción de los inductores de enzimas metabolizadoras de xenobióticos	15
1.5. Flavonoides en quimioprevención del cáncer	16
1.6. Derivados estructurales del heterociclo 3 <i>H</i> -1,2-ditio1-3-tiona en quimioprevención del cáncer	19
2. Justificación y objetivos	22
2.1 Justificación	23
2.2 Objetivos	24
3. Resultados y discusión	25
3.1 Química	26
3.1.1 Síntesis y caracterización fisicoquímica de Chalconas de partida	27
3.1.2 Síntesis y caracterización fisicoquímica de derivados del heterociclo 3 <i>H</i> -1,2-ditio1-3-tiona que permitirán generar los agentes híbridos	32
3.1.3 Síntesis y caracterización de agentes híbridos ditioltiona-chalcona (serie I)	43
3.1.4 Síntesis y caracterización de agentes híbridos ditioltiona-chalcona (serie II)	46
3.2 Evaluación biológica	53
3.2.1 Generalidades	53
3.2.2 Medida de Inducción de QR y GST para los compuestos de las series I y II	54
3.2.3 Determinación de los parámetros CD, IC ₅₀ e IQ	58
4. Conclusiones y perspectivas	61

4.1 Conclusiones y perspectivas	62
5. Materiales y métodos	63
5.1 Química	64
5.1.1 Materiales	64
5.1.2 Métodos	65
5.1.2.1 Síntesis de los reactivos para la preparación de los agentes híbridos	65
5.1.2.2 Síntesis de agentes híbridos ditioltiona-chalcona (serie I)	70
5.1.2.3 Síntesis de agentes híbridos ditioltiona-chalcona (serie II)	71
5.2 Evaluación biológica	73
6. Bibliografía	78
7. Agradecimientos	83

Resumen

La quimioprevención del cáncer involucra la prevención, retraso o reversión de los procesos de carcinogénesis a través de la ingesta de alimentos o agentes farmacéuticos. Uno de los mecanismos de protección contra la carcinogénesis es la inducción de enzimas involucradas en el metabolismo de carcinógenos, particularmente enzimas detoxificantes de fase II como glutatión S-transferasa (GST) y quinona reductasa (QR). La quimioprevención también se puede conseguir mediante la inhibición de la familia de enzimas citocromo P450 (CYP), ya que ciertas isoformas tienen la capacidad de activar compuestos procarcinógenos volviéndolos dañinos para las células. Se han encontrado diversos compuestos naturales y sintéticos que son capaces de inducir en distinto grado las enzimas de fase II.

En el presente trabajo se diseñaron y sintetizaron dos series de compuestos híbridos inductores de enzimas metabolizadoras de xenobióticos de fase II. Para ello, fueron diseñadas en una primera instancia dos grupos de compuestos precursores con funcionalidades farmacofóricas diferentes. Por un lado, el diseño y síntesis de análogos de flavonoides naturales, más precisamente de compuestos tipo chalconas, del cual nuestro grupo de investigación ha venido trabajando. Por otro lado, se propuso el diseño y síntesis de varios derivados del sistema heterocíclico 3H-1,2-ditio-3-tiona. Una vez generado estos precursores se continuó con el desarrollo de las dos series de compuestos híbridos los cuales se obtuvieron a través de la hibridación molecular de los fragmentos de partida.

Con la finalidad de determinar la capacidad inductiva de los compuestos desarrollados sobre las enzimas detoxificantes y de predecir los mecanismos moleculares involucrados, se llevaron a cabo ensayos in vitro sobre dos líneas celulares, que permiten evaluar la selectividad en la inducción enzimática por parte de estos compuestos. Por otra parte se estudió la citotoxicidad de los compuestos más relevantes frente a las líneas celulares empleadas.

De los nueve compuestos evaluados en el ensayo in vitro, ocho resultaron inductores de QR, mientras que en GST, los nueve derivados resultaron inductores al menos en una de las líneas celulares.

Además, se logró identificar tres compuestos híbridos inductores de QR y GST en ambas líneas celulares. Dos de estos derivados presentaron el comportamiento deseado, es decir inducción de enzimas de fase II con carácter monofuncional, mientras que el tercer derivado presentó carácter de inducción bifuncional.

Se identificó el híbrido MMC01126 como un muy buen agente quimiopreventivo aun mejorando el perfil de la t-Butilhidroquinona y 4-bromoflavona reconocidos agentes quimiopreventivos

Por todo lo mencionado cabe resaltar la importancia de generar estructuras híbridas a partir de dos posibles farmacóforos donde la actividad biológica lograda es consecuencia de un efecto sinérgico de la hibridación molecular.

Abreviaturas

Act- Actividad	SFB- Sulforrodamina B
ADN- Ácido Desoxirribonucleico	T.A- Temperatura ambiente
AE- Acetato de etilo	TCA- Ácido tricloroacético
AhR- Receptor de hidrocarburos aromáticos	Tris- Tris(hidroximetil)aminometano
Ah- acrónimo del inglés Aryl hydrocarbon	Wt- del Inglés Wild Type
ARN-Ácido Ribonucleico	XRE- Elemento de respuesta a xenobióticos
Arnt- Proteína translocadora de Ah	
ARE- Elemento de respuesta a antioxidantes	
BCA- Ácido bicinconínico	
BSA- Seroalbúmina Bovina	
CC- Cromatografía en columna	
CD- Concentración para duplicar la actividad enzimática de QR	
CDNB- 1-Cloro-2,4-dinitrobenceno	
COSY- Espectroscopía de correlación	
CYP- Citocromo p450	
DCC- <i>N,N'</i> -diciclohexilcarbodiimida	
DCPIP- 2,6-Diclorofenolindofenol	
DE- Desviación estándar	
DMAP- 4-Dimetilaminopiridina	
DMSO- Dimetilsulfóxido	
EDTA- Ácido etilendiaminotetracético	
EP- Éter de petróleo	
Et ₂ O- Éter etílico	
EtOH- Etanol	
Fv4Br- 4'-Bromoflavona	
GSH- Glutación Reducido	
GST- Glutación-S-transferasa	
HMBC- Experimento bidimensional de correlación heteronuclear a distancia	
HSQC- Experimento bidimensional de correlación heteronuclear a un enlace	
IC ₅₀ - Concentración Inhibitoria del 50%	
IQ- Índice de quimioprevención	
IARC- Acrónimo del inglés International Agency for Research on Cancer	
Keap1- del inglés Kelch-like ECH associated protein 1	
MeOH- Metanol	
MO- Microondas	
Nrf2- del inglés Nuclear NF-E2 related factors	
OMS- Organización Mundial de la Salud	
PBS-Solución Buffer Fosfato	
PHA- Hidrocarburo policíclico aromático	
QR- Quinona Reductasa	

1. Introducción

1.1 Aspectos generales del cáncer

Cáncer es un término genérico que designa un amplio grupo de enfermedades que tienen la potencialidad de afectar a cualquier parte del organismo¹. Se considera al cáncer como una enfermedad genética, resultado de una proliferación anómala de un clon celular. Una célula anormal que no prolifere más que sus vecinas normales, no produce ningún daño significativo, en cambio, si su proliferación está fuera de control se generará un tumor o neoplasma. Si estas células tumorales permanecen agrupadas en una masa única se dice que el tumor es **benigno** y en este estadio generalmente se puede conseguir la curación completa extrayendo la masa tumoral mediante cirugía oncológica. Por el contrario, un tumor se considera canceroso, sólo si es **maligno**, es decir si sus células tienen la autonomía para invadir tejidos circundantes o distantes. La capacidad invasora implica, generalmente, la habilidad de liberarse, entrar en el torrente sanguíneo o en los vasos linfáticos y formar tumores secundarios o **metástasis** en lugares diferentes al del tumor primario².

En nuestro organismo existen unos 200 distintos tipos de células y si bien en principio cualquiera de ellas puede potencialmente originar un tumor, en realidad el 90% de los tumores son generados por células epiteliales, denominándose *carcinomas*. Los otros tipos mayoritarios de cánceres son los *sarcomas*, derivados de células de tejidos conectivo o muscular, las *leucemias*, *linfomas* y *mielomas*, originados por células de la sangre y los *neuroblastomas* y *gliomas*, que derivan de células del sistema nervioso³.

Entre los diversos rasgos que caracterizan a las células cancerosas y que determinan su comportamiento, distinguiéndola de las células normales, se pueden exhibir diferencias tanto morfológicas como funcionales⁴:

Morfológicas

- las células cancerosas presentan tamaño y forma irregular (pleomorfismo).
- contienen núcleos grandes con mucho contenido de ADN.
- presentan pérdida de la polaridad y como resultado tienen un crecimiento desorganizado.
- presentan una tasa de proliferación elevada, alta tasa de mitosis.
- exhiben escasa diferenciación celular (Anaplasia).

Funcionales

- las células tumorales presentan proliferación autónoma.
- capacidad de difundir a distancia de su lugar de origen y metastizar.
- capacidad de evasión del sistema inmune y de mecanismos apoptóticos.
- potencial replicativo ilimitado.
- alteraciones en su material genético, como en la expresión de la información contenida en él.

Epidemiología

En Uruguay, los tumores malignos constituyen la segunda causa de muerte detrás de las enfermedades cardiovasculares, dando cuenta actualmente de más del 24 % de todas las defunciones anuales. (figura1.1) ⁵

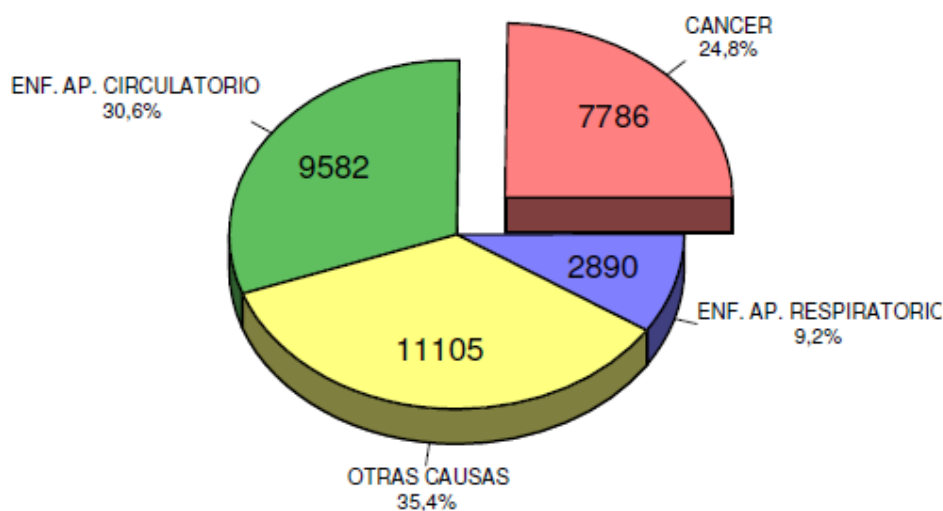


Figura 1.1- Distribución de las causas de mortalidad en el año 2008 en Uruguay⁵

Como se muestra en la figura 1.2 los tipos de cánceres más frecuentes y de mayor mortandad, en hombres y mujeres uruguayos entre los años 2004 y 2008 y según el Registro Nacional de Cáncer, son el cáncer de pulmón y próstata en el hombre y el cáncer de mama en la mujer ⁵.

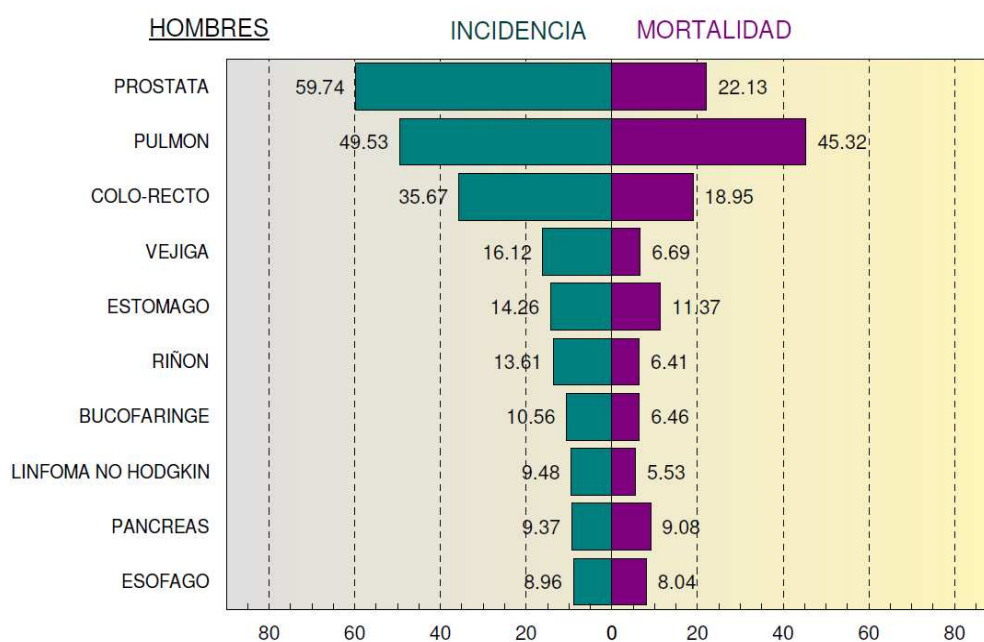




Figura 1.2- Incidencia del cáncer en hombres y mujeres uruguayos entre 2004 y 2008. Se expresa la tasa de incidencia ajustada a la población⁵.

1.2 Principios generales de la carcinogénesis

El proceso por el cual una célula normal se transforma en una célula cancerosa se denomina carcinogénesis. Para que esto ocurra se requieren varias mutaciones en varios genes y eso sucede a través de mucho tiempo, a veces años, de estar expuestos a un agente carcinogénico. Los carcinógenos son, sencillamente, agentes endógenos o exógenos que causan mutaciones en proto-oncogenes, genes supresores de tumores y posiblemente en genes de reparación del ADN³. Los diferentes grupos de agentes carcinogénicos son agrupados según la IARC (*International Agency for Research on Cancer*) en cuatro categorías⁶:

- Grupo 1: Carcinógeno para humanos
- Grupo 2A: Probablemente carcinógeno para los humanos
- Grupo 2B: Posiblemente carcinógenos para los humanos
- Grupo 3: No es clasificable en cuanto a su efecto carcinógeno para los seres humanos
- Grupo 4: Probablemente no carcinógeno para los seres humanos

La mayoría de las neoplasias son consecuencia de un agente carcinógeno que provoca alteraciones en el ADN. Algunos de estos agentes carcinógenos son⁷:

- **Tabaco:** el riesgo de contraer cáncer de pulmón es de 10 a 20 veces mayor en fumadores que en no fumadores; el 90% de las muertes por cáncer de pulmón se deben a este hábito. Además puede provocar cánceres del tracto respiratorio superior, tracto genito urinario, tracto gastrointestinal y páncreas.
- **Radiaciones ionizantes:** estas radiaciones tienen un gran potencial para inducir mutaciones. Incluye rayos de longitud de onda corta, tal como rayos X, rayos cósmicos y rayos gamma. Estas

radiaciones causan la ionización del agua y otras sustancias, y los efectos mutagénicos se producen indirectamente a causa de esta ionización. Debido a esta radiación se forman radicales libres, siendo el más importante el radical hidroxilo, los cuales reaccionan e inactivan macromoléculas constituyentes celulares, siendo la más importante el ADN, ya que los cambios inducidos en él tienen un efecto permanente.

- **Radiaciones no ionizantes:** la radiación UV natural procedente del sol puede provocar cáncer de piel. La muerte de las células por radiación UV se debe principalmente a su acción sobre el ADN. Uno de sus efectos es la inducción de dímeros de pirimidina en el ADN, un estado en el que dos bases pirimidínicas adyacentes (citosina o timina) se unen covalentemente, de manera que se incrementa en gran medida la probabilidad de que durante la replicación del ADN, la ADN polimerasa inserte un nucleótido incorrecto.
- **Carcinógenos químicos:** algunos de estos agentes son; agentes alquilantes como la ciclofosfamida, el busulfán usados en tratamiento del cáncer; hidrocarburos aromáticos, presentes en el humo del cigarrillo; colorantes azo, colorante de anilina usado en la industria del caucho; carcinógenos naturales, como es el caso de las aflatoxinas producidas por *Aspergillus Flavus*; nitrosaminas y amidas, pueden sintetizarse en el aparato gastrointestinal e inducir la aparición de cáncer gástrico.
- **Virus de ADN y ARN:** distintos virus hacen que se desarrolle cáncer en animales y algunos otros también intervienen en el desarrollo del cáncer en humanos. Ejemplos de estos son, virus de la leucemia de las células T humanas (HTLV), virus de la inmunodeficiencia humana (HIV), flavivirus hepatitis C (HCV), los papilomavirus (HPVs), el virus Epstein Barr (EBV), entre otros.

El modelo clásico de desarrollo tumoral divide el proceso de la carcinogénesis en tres fases: iniciación, promoción y progresión⁸ (ver *figura1.3*):

- **Iniciación:** comienza con una alteración inicial en alguna célula individual integrante de un tejido, como resultado de la actividad tóxica de un carcinógeno químico bajo la exposición de una dosis única. Esta célula alterada recibe el nombre de célula iniciada y en ella los controladores del ciclo celular no funcionan de modo correcto. En esta primera etapa, son tres los procesos celulares que están implicados: el metabolismo del xenobiótico, la reparación del ADN y la proliferación celular.

Varias son las características de la fase de iniciación:

- la iniciación es un proceso irreversible
 - es un evento genético de baja frecuencia
 - es un fenómeno rápido
 - es dosis dependiente
 - tiene memoria
- **Promoción:** en esta etapa la célula iniciada se transforma en una población perceptible de células precancerosas como resultado de importantes alteraciones en la expresión de genes y en la proliferación celular.

La característica principal de la promoción es la multiplicación selectiva de las células iniciadas, aunque también se pueden señalar otras características de esta etapa

- puede ser una fase reversible
 - requiere un período largo de acción durante el cual se necesita la presencia del agente promotor
 - los sucesos genotóxicos y mutacionales no parecen ser necesarios en esta etapa
 - es una etapa susceptible de ser modulada por factores fisiológicos: edad, dieta, actividad humoral, etc
 - se requieren dosis relativamente altas del promotor. Los agentes promotores, por debajo de una cierta dosis umbral no son efectivos
- **Progresión:** la secuencia que transcurre desde la iniciación hasta la promoción produce sólo lesiones preneoplásicas y tumores benignos. En la progresión la célula iniciada se convierte en una célula potencialmente maligna. Algunas características de esta etapa son:
 - proceso irreversible
 - existencia de alteración en la estructura genómica que se refleja en la inestabilidad cariotípica (aparición de aberraciones cromosómicas, alteraciones en el aparato mitótico, en la función de los telómeros, hipometilación del ADN, recombinación, amplificación y transposición génica aberrantes
 - selección celular multifocal (conversión maligna)

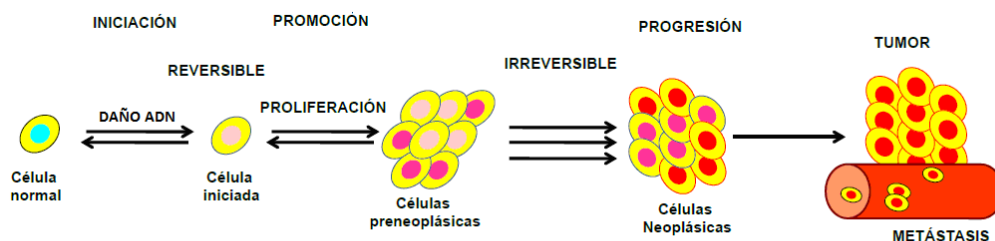


Figura 1.3 - Secuencia de eventos de la carcinogénesis. Esquema de un modelo simple de tres fases, iniciación, promoción y progresión.

1.3 Quimioprevención del cáncer

La quimioprevención del cáncer consiste en la utilización de determinadas sustancias químicas, naturales o sintéticas, que tienen como objetivo impedir, retrasar o revertir la carcinogénesis evitando el desarrollo de una neoplasia maligna invasora⁹.

Según Wattenberg, los agentes quimiopreventivos pueden ser clasificados en agentes **bloqueantes** y agentes **supresores** dependiendo de cual sea su diana terapéutica. Los primeros apuntan a prevenir la aparición de daños en macromoléculas biológicas como el ADN, ARN y proteínas e incluyen: agentes que reducen la síntesis de carcinógenos, que inhiben su activación metabólica o potencian su detoxificación, compuestos antioxidantes que eliminan radicales libres o sustancias que en una última etapa “secuestran” al carcinógeno impidiendo su interacción con el ADN. A diferencia de los agentes bloqueantes, la mayoría de los agentes supresores apuntan a interferir con las etapas de promoción y de progresión de la carcinogénesis, influyendo en la proliferación, diferenciación o muerte celular^{10,11} (ver figura 1.4).

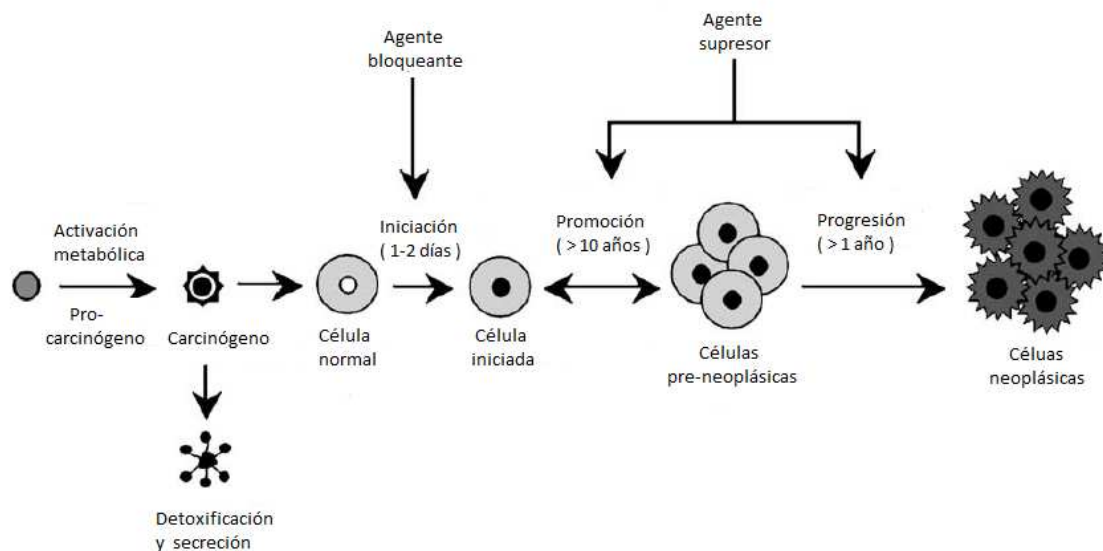


Figura 1.4 – Modos de acción de agentes bloqueantes. Los agentes bloqueantes inhiben la iniciación, paso en el cuál una célula normal se transforma en una célula mutada. Los agentes supresores inhiben las etapas subsiguientes que llevan a la formación del tumor maligno. Adaptado de ¹².

En 1996 Kelloff y colaboradores sugirieron tres grandes blancos y diversos procesos a través de los cuales un agente quimiopreventivo puede actuar; en estos se incluyen 1) mecanismos a través de los cuales es bloqueada la acción de carcinógenos, 2) ejerciendo un rol como antioxidantes o antiinflamatorios y 3) actuando como moduladores de la proliferación celular¹³.

Los compuestos que ejercen su acción en la etapa de iniciación comprenden mayoritariamente agentes moduladores de enzimas detoxificantes de xenobióticos, inhibiendo la familia de citocromos P450 que

activan procarcinógenos a metabolitos genotóxicos e induciendo enzimas detoxificantes de fase II como GST (Glutatión-S-transferasa) y QR (Quinona reductasa). Los agentes que controlan la proliferación celular pueden actuar inhibiendo la síntesis de ADN (como los inhibidores de topoisomerasa II), o induciendo la apoptosis o la diferenciación celular. Algunos factores pueden actuar modulando selectivamente la respuesta de determinados receptores celulares, por ejemplo frente a hormonas (como el tamoxifeno) o factores de crecimiento. Asimismo, los agentes que interfieren con el proceso de inflamación pueden bloquear o disminuir la tasa de proliferación celular, disminuyendo la actividad de las enzimas que participan en el metabolismo del ácido araquidónico (ciclooxygenasas y lipooxygenasas). Estas dos vías son uno de los mecanismos principales de producción de citoquinas y de inducción de la división celular. Finalmente, la inhibición del metabolismo de las poliaminas, compuestos que incrementan la proliferación, también se asocia con una disminución de la promoción y progresión del cáncer. Otro grupo de compuestos, como los inhibidores de la angiogénesis, pueden prevenir el crecimiento y progresión de la carcinogénesis, dada la necesidad de neovascularización para nutrir un tumor en crecimiento. Se ha sugerido que el receptor VEGF (receptor de factores de crecimiento del endotelio vascular) podría ser un nuevo blanco para bloquear la angiogénesis^{14,15}.

Diferentes estudios han indicado que la acción protectora de los agentes quimiopreventivos no puede ser atribuida a un solo mecanismo sino que debe de explicarse sobre la base de mecanismos moleculares diferentes¹⁶ (ver figura 1.5). Uno de los mecanismos moleculares más estudiado en los últimos años incluye la modulación de la actividad de las enzimas de fase I y II que resulta en una disminución de la carcinogenicidad de xenobióticos¹⁷.

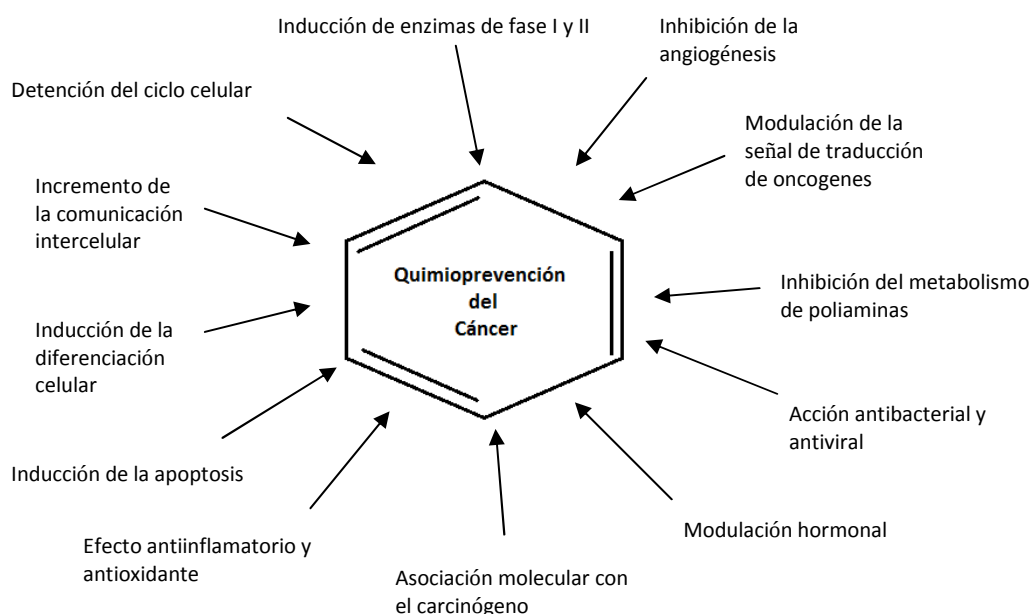


Figura 1.5 - Diferentes mecanismo por los cuales los agentes quimiopreventivos ejercen su acción protectora. Adaptado de ¹⁶

1.4 Modulaci3n de enzimas metabolizadoras de xenobi3ticos como mecanismo quimiopreventivo para el c3ncer

1.4.1 Enzimas de fase I y II

Un xenobi3tico (del griego, *xenos*, extra1o) es un compuesto ajeno al organismo. Las principales clases de xenobi3ticos de importancia m3dica son los f3rmacos, carcin3genos qu3micos de naturaleza org3nica (plaguicidas, hidrocarburos polic3clicos arom3ticos, bifenilos policlorados, dioxinas, furanos) e inorg3nica (metales pesados, 3cidos, 3lcalis, 3xidos, radicales) entre otros. Estos compuestos, a diferencia de lo que ocurre con los compuestos vol3tiles cuya eliminaci3n se facilita a trav3s del intercambio gaseoso en los pulmones o por medio de filtraci3n renal, presentan generalmente naturaleza qu3mica lipof3lica por lo que tienden a acumularse en el organismo pudiendo desencadenar potenciales eventos de toxicidad. El h3gado es el 3rgano que participa en forma mayoritaria en la eliminaci3n de los xenobi3ticos, mediante un conjunto de reacciones, denominadas de biotransformaci3n, en las que se modifica la estructura qu3mica de los xenobi3ticos para incrementar su hidrosolubilidad y as3 facilitar su eliminaci3n.

Williams, en 1967 sugiri3 que las reacciones que involucran el metabolismo de xenobi3ticos pod3an ser divididas en dos fases. Bajo la denominaci3n de **fase I** se agrupan reacciones de diferente naturaleza qu3mica como oxidaciones, reducciones, deshalogenaciones, reacciones de hidr3lisis entre otras, que dan como resultado la aparici3n de nuevos grupos funcionales en los xenobi3ticos determinando diferentes propiedades fisicoqu3micas a las iniciales como son, aumento de la polaridad, de la reactividad y decremento de la lipof3lia. Las reacciones de fase I son catalizadas en su mayor3a por un grupo de enzimas microsomales pertenecientes a la superfamilia de los citocromos P450 (CYP). Estas enzimas son monooxigenasas que hacen uso del ox3geno molecular, del cual adquieren uno de los 3tomos para oxigenar al xenobi3tico al tiempo que el otro 3tomo resulta reducido dando agua como producto. Tales modificaciones resultan generalmente en la incorporaci3n de centros electrof3licos en la mol3cula susceptibles a reaccionar con especies cargadas negativamente o que presenten densidad de carga negativa, como son los 3cidos nucleicos o prote3nas. As3 los aductos generados en esta instancia (aldeh3dos, ep3xidos, carbonilos α,β -insaturados, entre otros) pueden provocar el desencadenamiento de la carcinog3nesis.

Generalmente, los xenobi3ticos que fueron modificados en la fase I se unen de manera covalente a ligandos end3genos como glutati3n, grupos acetilo, metilo, sulfato y 3cido glucor3nico; acci3n que es llevada a cabo con frecuencia por enzimas del tipo transferasas, como son, glutati3n S-transferasas (GSTs), NAD(P)H quinona oxidoreductasa (QR), UDP-glucuronosil-transferasa, ep3xido hidrolasa, hemooxigenasa 1, entre otras. Este tipo de modificaciones son las que se enmarcan dentro de las reacciones de **fase II** y contribuyen considerablemente con el aumento de la hidrosolubilidad y posterior eliminaci3n del organismo, de ah3 que a estos procesos se les conoce tambi3n con el nombre de reacciones de detoxificaci3n^{18,19,20,21}.

Los agentes inductores de las enzimas metabolizadoras de xenobi3ticos se clasifican en dos clases: **inductores monofuncionales** e **inductores bifuncionales**. Los inductores bifuncionales elevan la expresi3n tanto de los genes que codifican para las enzimas de fase I como los que codifican para las enzimas de fase II, dentro de estos se encuentran, TCDD (2,3,7,8-tetraclorodibenzo-*p*-dioxina), β -naftoflavona (β NF), colorantes azo, PAH, entre otros. Por el contrario, los **inductores monofuncionales**

elevan las actividades de las enzimas de fase II selectivamente, provocando un incremento en la transcripción de los genes que las codifican. Dentro de este grupo se encuentran, antioxidantes fenólicos (BHA, BHT), aceptores de Michael, flavonoides, 1,2-ditiol-3-tionas, isotiocianatos, cumarinas, tiocarbamatos, entre otros^{22,23}.

1.4.2 Generalidades del mecanismo de acción de los inductores de enzimas metabolizadoras de xenobióticos

Las células presentan mecanismos de defensa contra los diferentes carcinógenos a los que se enfrenta día tras día, uno de estos mecanismos es la vía de respuesta a antioxidantes, un sistema inducible de protección celular. El propósito de esta vía es incrementar la expresión de genes que codifican para enzimas implicadas en el metabolismo de xenobióticos. Los integrantes principales de esta vía son: 1) el elemento de respuesta a antioxidantes ARE; 2) el factor de transcripción Nrf2 (*NF-E2 related factors*), y 3) el represor citosólico de Nrf2, Keap1 (*Kelch-like ECH-associated protein 1*)²⁴.

El Nrf2 es integrante de la familia de los factores de transcripción del tipo “cap n collar” con dominio de unión al ADN del tipo cremallera de leucina en los extremos C-terminal lo que le permite el reconocimiento por el elemento de respuesta antioxidante ARE en el promotor de los genes dianas y posterior activación de la expresión génica²⁵. En condiciones basales Nrf2 se encuentra unido a Keap1 en el citoplasma marcándolo para su ubiquitinación por el complejo Cul3/Rbx1/E2 seguido de degradación por el proteasoma 26S. La exposición frente a factores de estrés y/o agentes inductores conduce a la disociación de Nrf2 de Keap1, rescatando Nrf2 de la degradación proteosomal y permitiendo que ingrese al núcleo y se combine con otros factores de transcripción formando heterodímeros que se unen al elemento ARE. De esta forma se incrementa la transcripción de **genes codificantes de enzimas de fase II**^{26,27,28}.

En los últimos años se ha venido investigando el mecanismo por el cual Keap1 se disocia de Nrf2, y en la actualidad existen dos mecanismos principales, que pueden trabajar en forma conjunta o independiente, a través del cual se puede explicar esto. El primer mecanismo implica modificaciones en la proteína represora Keap1 mientras que el segundo implica la activación de Nrf2. En el primero, la presencia de estrés oxidativo y las especies electrófilas, o ambos, conduce a la oxidación o modificaciones covalentes de tioles de cisteínas específicas (Cys151, 277 y 288) en regiones de Keap1. Esto induce cambios estructurales en Keap1 los que promueve la liberación de Nrf2^{29,30,31}. En el segundo mecanismo implicado, el Nrf2 es activado por varias vías de señalización en las que participan diversas proteínas quinasas como por ejemplo, la proteína quinasa C y proteínas quinasas activadas por mitógenos. La fosforilación de Nrf2 en residuos de serina y treonina por medio de estas quinasas modifican las interacciones de Nrf2 con Keap1, lo que permite la disociación de las dos proteínas³².

No obstante, en la inducción de los **genes codificantes para enzimas de fase I** se ve implicada una región en el extremo 5' del gen del citocromo P450 1A1 en la que se encuentra una secuencia denominada XRE (elemento de respuesta a xenobióticos), que también ha sido encontrada corriente arriba de genes que codifican enzimas de fase II como QR y GST. Existen dos proteínas reguladoras que median la inducción a través del elemento XRE, el receptor de hidrocarburos aromáticos (Ahr), y una proteína translocadora que interviene en el transporte de Ah unido a su ligando (inductor) hacia el núcleo, la misma se denomina Arnt (*Ah receptor nuclear translocator*)³³. Por consiguiente, los inductores

que actúan mediante el elemento XRE y el receptor Ah incrementan simultáneamente los niveles de expresión de los genes de fase I y II, mientras que lo que actúan vía Nrf2-ARE activan selectivamente genes de fase II (ver figura 1.6).

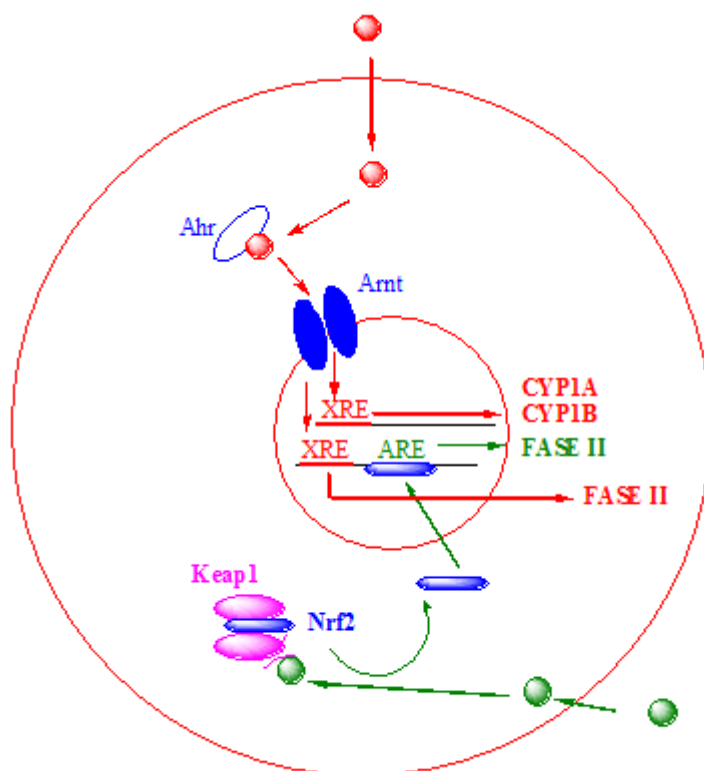


Figura 1.6 - Inducción de enzimas de fase I y II por inductores monofuncionales y bifuncionales. Los inductores monofuncionales (en verde) entran a la célula y reaccionan con los grupos sulfhidrilos de Keap1, que actúa como “sensor” transmitiendo las señales inductoras (Nrf2) para activar la transcripción de los genes de fase II a través de la secuencia ARE. Los inductores bifuncionales (en rojo) pueden actuar por dos mecanismos diferentes: a) Unirse directamente al receptor de Ah (Ahr) en el citoplasma, con la subsecuente translocación del complejo al núcleo y unión al elemento XRE de los genes de fase I para activar su transcripción. b) Además de la secuencia ARE, algunos genes de fase II también contienen la secuencia XRE funcional y por tanto pueden ser activados por este complejo³⁴.

1.5 Flavonoides en quimiopreención del cáncer

Los flavonoides naturales representan el grupo de polifenoles más ampliamente distribuido. Pueden ser encontrados en frutas, verduras, granos, flores, semillas, bebidas como el café, té verde y negro, vino tinto, cerveza y soja, entre otros. En la actualidad, ya se han identificado más de 9000 flavonoides diferentes³⁵. Los flavonoides pueden agruparse en diferentes clases según el estado de oxidación que presenten los átomos de carbono que forman la estructura, las más representativas son: chalconas, flavonas, flavanoles (catequinas, proantocianidinas), flavanonas, flavonoles e isoflavonas (ver figura 1.6). Se pueden definir desde un punto de vista estructural como derivados de difenilpropano con un esqueleto carbonado del tipo C6-C3-C6, en donde C6 se corresponde con dos anillos aromáticos (A y B)

y C3 es en general un heterociclo oxigenado (C). Si se consideran las chalconas, el anillo C se encuentra abierto generando un puente de tres átomos de carbono entre los anillos A y B (ver figura 1.7). Las chalconas son consideradas como una subclase de los flavonoides porque comparten la misma ruta biosintética, se forman por acción de la enzima chalcona sintasa y en una reacción posterior de ciclización catalizada por la enzima chalcona isomerasa dan origen a los flavonoides³⁶.

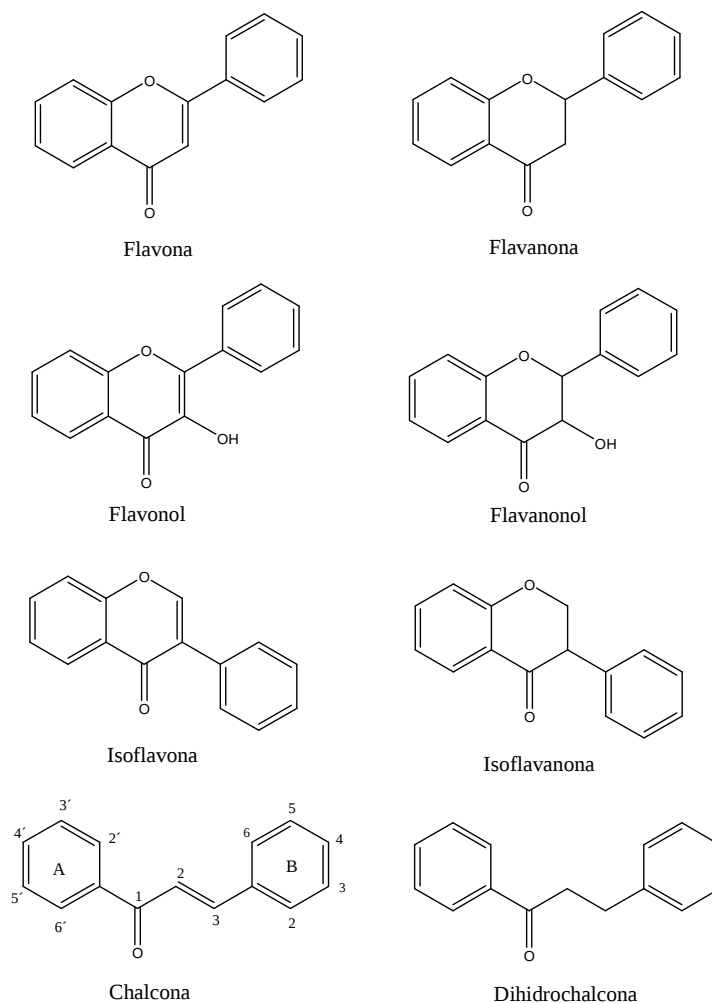


Figura 1.7 - Clasificación de los principales grupos de flavonoides. En la estructura de la chalcona se indica la numeración de los carbonos y el nombre de los anillos.

En el desarrollo de las neoplasias, no sólo toman un rol importante los factores genéticos y ambientales sino que también la alimentación juega un rol trascendental. Se ha demostrado en animales de experimentación que una gran variedad de componentes de las dietas pueden estimular el desarrollo y crecimiento tumoral, convirtiendo células normales en células cancerosas^{37,38}. No obstante, se ha observado en los últimos años, a través de diversos estudios realizados en diferentes líneas celulares humanas, modelos animales y ensayos epidemiológicos, una relación inversa entre el consumo de flavonoides, presentes en frutas y verduras, y el riesgo de desarrollar un cáncer^{9,39,40}.

Uda y colaboradores han determinado ciertos requerimientos estructurales que tienen los flavonoides para lograr la inducción de enzimas metabolizadoras de xenobióticos de fase I y II. Por ejemplo, la hidroxilación del anillo B no es esencial para la inducción, ya que la galangina y el kaemferol (figura 1.8), con 0 y 1 hidroxilo en el anillo B, respectivamente, son mejores inductores que la quercetina la cual

presenta 2 hidroxilos en el anillo B, ver *figura 1.8*. Estos autores observaron también que la presencia de un doble enlace entre los carbonos 2 y 3 del anillo C era esencial para la inducción, puesto que la taxifolina, que tiene el mismo patrón de sustitución que la quercetina, pero carece de doble enlace en la posición 2-3, no es un inductor, ver *figura 1.8*. Concluyeron también que la presencia de un grupo hidroxilo en posición 3 del anillo B no es esencial para la actividad pero potencia la capacidad inductora⁴¹.

Los flavonoides naturales más abundantes son los flavonoles kaempferol y quercetina. El tratamiento de células MCF-7 con quercetina 15 μM durante 24 h produce un incremento en la actividad de las enzimas QR y GST. El mecanismo responsable de la inducción de los genes que codifican para estas enzimas está mediado por el elemento ARE⁴². El kaempferol también incrementa la actividad QR 1.8 veces en células Hepa 1c1c7 evaluado a una concentración de 20 μM ⁴³. Además, ambos flavonoides son ligandos del receptor Ah y poseen distintos efectos sobre la expresión de los citocromos P450. El mismo depende de la subclase de CYP analizada, así como también de la línea celular utilizada. A modo de ejemplo, la quercetina aumenta la actividad de CYP1A1 pero disminuye la de la mayoría de otras familias y subclases de CYP. Por el contrario, el kaempferol no afecta la actividad CYP1A1. Por lo tanto la quercetina se comporta en la mayoría de los casos como un inductor monofuncional¹⁷. Por otro lado, se encontró que el isoflavonoide genisteína (*figura 1.8*) es un inductor monofuncional de QR, es decir que incrementa su actividad sin inducir las enzimas CYP450. Asimismo, la chalcona xanthumol (*figura 1.8*), presente en lúpulo y cebada, es también un inductor monofuncional de las enzimas de fase II QR y GST⁴⁴.

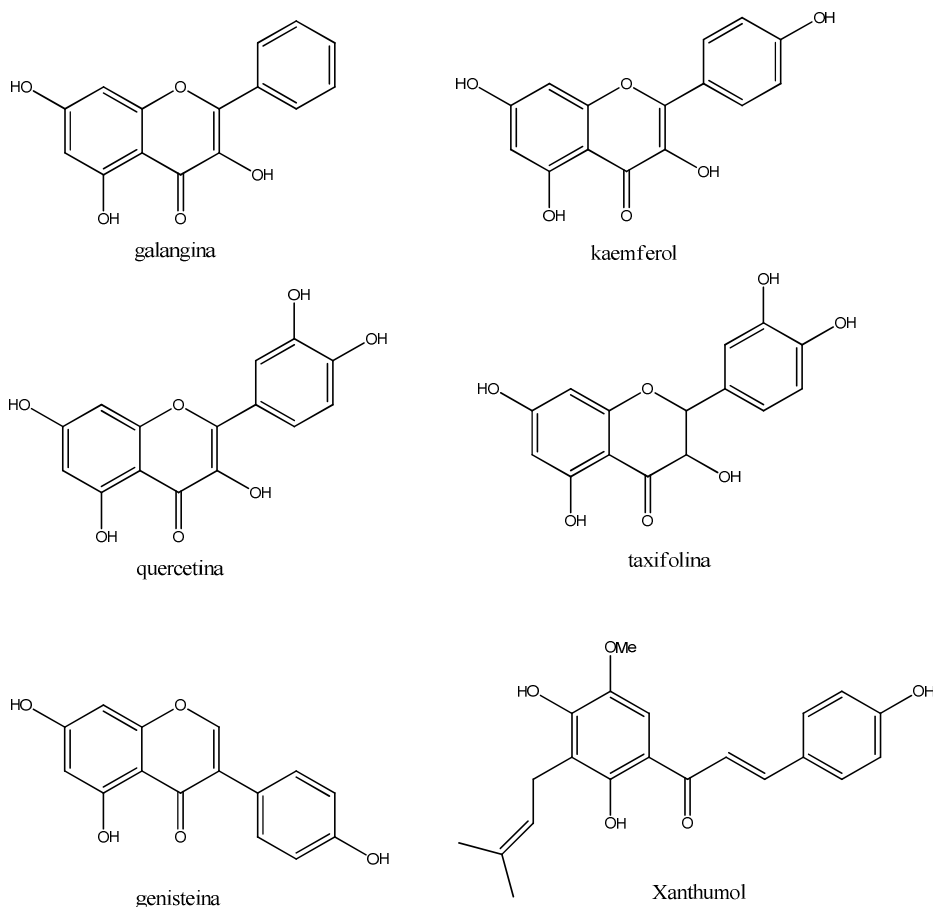


Figura 1.8 - Estructura de flavonoides moduladores de enzimas metabolizadas de xenobióticos.

1.6 Derivados estructurales del heterociclo 3H-1,2-ditio-3-tiona en quimioprevención del cáncer

Durante cientos de años ha existido una búsqueda incesante para encontrar aquellos alimentos que tienen la capacidad de prevenir el cáncer u otras enfermedades. En 1915 Frederick L. Hoffman escribió, en base a consideraciones generales propuestas por autores más antiguos, “que existe una relación directa entre el consumo de determinados alimentos y la probabilidad de desarrollar cáncer u otra patología”⁴⁵; por ejemplo, se ha descrito en la literatura que ciertos vegetales como *Brassica* (brócoli) proporcionan gran variedad de compuestos organosulfurados que poseen actividad anticancerígena y antimutagénica⁴⁶. En 1958 un grupo de investigadores alemanes aislaron de repollo y repollito de Bruselas dos compuestos heterocíclicos organosulfurados pertenecientes a la familia de las 1,2-ditio-3-tiona. Una se identificó como la 3H-1,2-ditio-3-tiona (**D3T**), una ditioltiona no sustituida; la otra se sugirió que poseía un anillo aromático oxigenado en la posición 5 (**ADT**, ver figura 1.9). En estudios siguientes se encontró que estos compuestos se presentaban en muy baja cantidad en las plantas de las cuales se aislaron inicialmente, pero plantearon la posibilidad de que se formaran *in vivo* por biotransformación de precursores que se encuentran en estas especies⁴⁷. Los primeros usos farmacológicos que se le atribuyeron a las ditioltionas fueron en el tratamiento de la esquistosomiasis (siendo uno de los fármacos más representativo **Oltipraz**, figura 1.9)^{48,49}, una enfermedad causada por varias especies de trematodos, y a su uso como agentes coleréticos (donde se ha usado **ADT**), aumentando la secreción salivar⁵⁰. Se ha demostrado también que varios derivados del heterociclo 3H-1,2-ditio-3-tiona (ver figura 1.9) tienen la capacidad de inducir enzimas de fase II como QR y GST, evitando de esta forma el desarrollo de la carcinogénesis⁵¹.

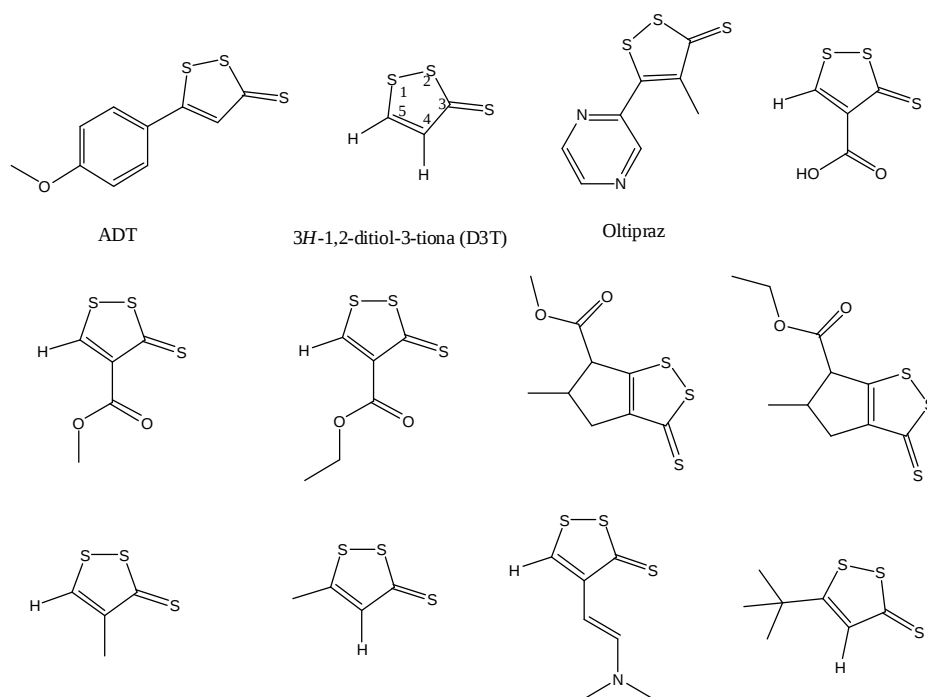


Figura 1.9 – Compuestos de la familia de las ditioltionas capaces de actuar como potenciales agentes quimiopreventivos de cáncer a través de la inducción de enzimas citoprotectoras de fase II.

El compuesto más ampliamente estudiado dentro de las ditioltionas como potencial agente inductor de enzimas citoprotectoras de fase II ha sido Oltipraz (*figura 1.9*). La capacidad de éste para inducir dichas enzimas tanto *in vivo*⁵² o *in vitro*⁵³ fue sugerido por primera vez por Ansher y col., en el estudio de la acción del Oltipraz como agente anti-esquistosomiasis. Estos autores observaron que los niveles de GSH no sólo aumentaban en el gusano parásito sino que también se incrementaban en el huésped, lo que los llevo a la hipótesis de que Oltipraz podría actuar como un potencial agente quimiopreventivo para el cáncer⁴⁸. Unos años más tarde Watterberg y Bueding corroboraron esta predicción al administrar Oltipraz a ratones a los cuales se los sometía a diferentes grupos de carcinógenos, entre ellos, benzo[a]pireno y dietilnitrosoamina. Frente al primero observaron una reducción de un 30% en adenoma pulmonar y frente al segundo, un 50% de reducción en tumores estomacales, demostrando la capacidad quimiopreventiva que poseía Oltipraz y presumían Anshher y sus colaboradores⁵⁴. Estudios posteriores también demuestran que Oltipraz tiene la capacidad de reducir el desarrollo de cáncer en diferentes órganos al administrar carcinógenos específicos para cada órgano^{52,55}. Sobre Oltipraz, también se realizaron estudios de Fase IIa y IIb con 234 personas de la República de China, de forma de demostrar directamente el rol que cumplía el mismo, en el metabolismo de carcinógenos en humanos. Los residentes de estas zonas tenían un alto riesgo de desarrollar carcinomas hepatocelular en parte debido al consumo de alimentos contaminados con aflatoxina B1 (AFB1). En el estudio de fase IIa se encontró que 125 mg/día eran suficientes para incrementar significativamente los niveles del metabolito de AFB1 resultante de la vía del ácido mercaptúrico en la orina. En estudios de fase IIb se observó que la administración de 500 mg de oltipraz una vez a la semana producía una reducción significativa del biomarcador aducto aflatoxina-albúmina en sangre⁵⁶ (ver *figura 1.10*).

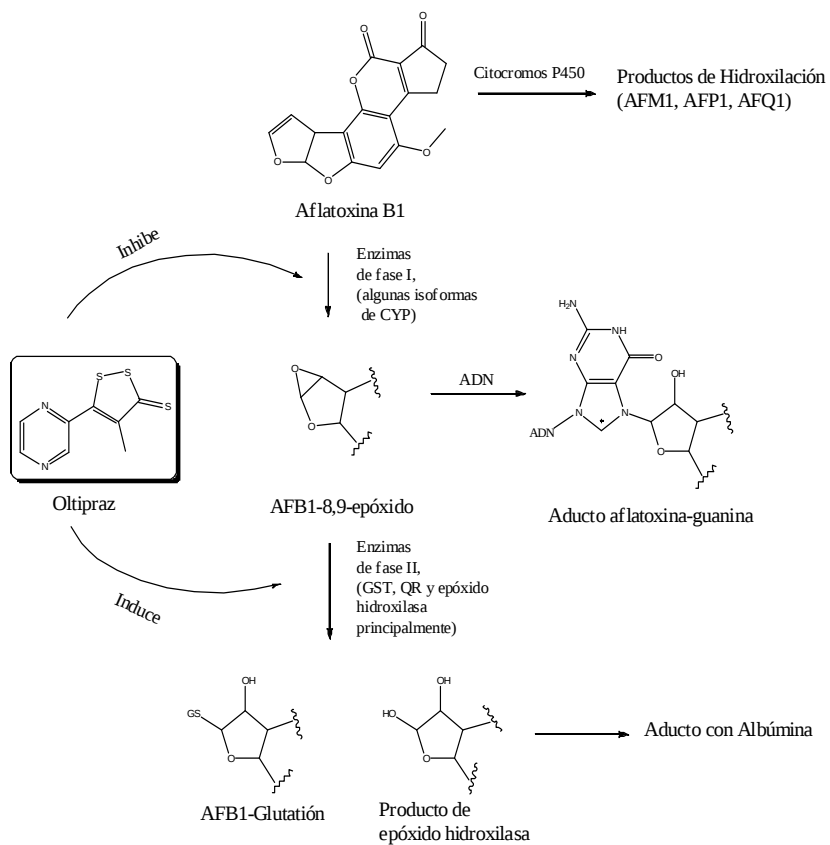


Figura 1.10 – Efecto de Oltipraz sobre el metabolismo de la aflatoxina B1. Se observa que el efecto quimiopreventivo puede ser atribuido a su habilidad de inducir la expresión de genes de fase II, como a su capacidad inhibitoria de la bioactivación de procarcinógenos catalizada por citocromos P450.

2. Objetivos y justificación

2.1 Justificación

Como se explicó anteriormente la carcinogénesis es un complejo proceso que es iniciado por eventos donde un agente endógeno o exógeno daña una macromolécula de un organismo. Los agentes quimiopreventivos son capaces de suprimir la activación metabólica del carcinógeno o bloquear la formación final del mismo. Estudios recientes han demostrado que el incremento de actividad de enzimas de fase II, como QR y GST, se correlaciona con la protección frente a carcinogénesis inducida químicamente.

Específicamente, nuestro grupo ha demostrado que ciertos flavonoides sintéticos son capaces de incrementar la actividad de estas enzimas en hígados de ratas tratadas oralmente con los mismos (*figura 2.1*)⁵⁷. Por otro lado, derivados sencillos del sistema heterocíclico 1,2-ditio-3-tiona han demostrado ser excelentes inductores de genes de enzimas de fase II (*figura 2.2*). Sin embargo, no se han estudiado compuestos híbridos de este heterociclo con capacidad quimiopreventiva.

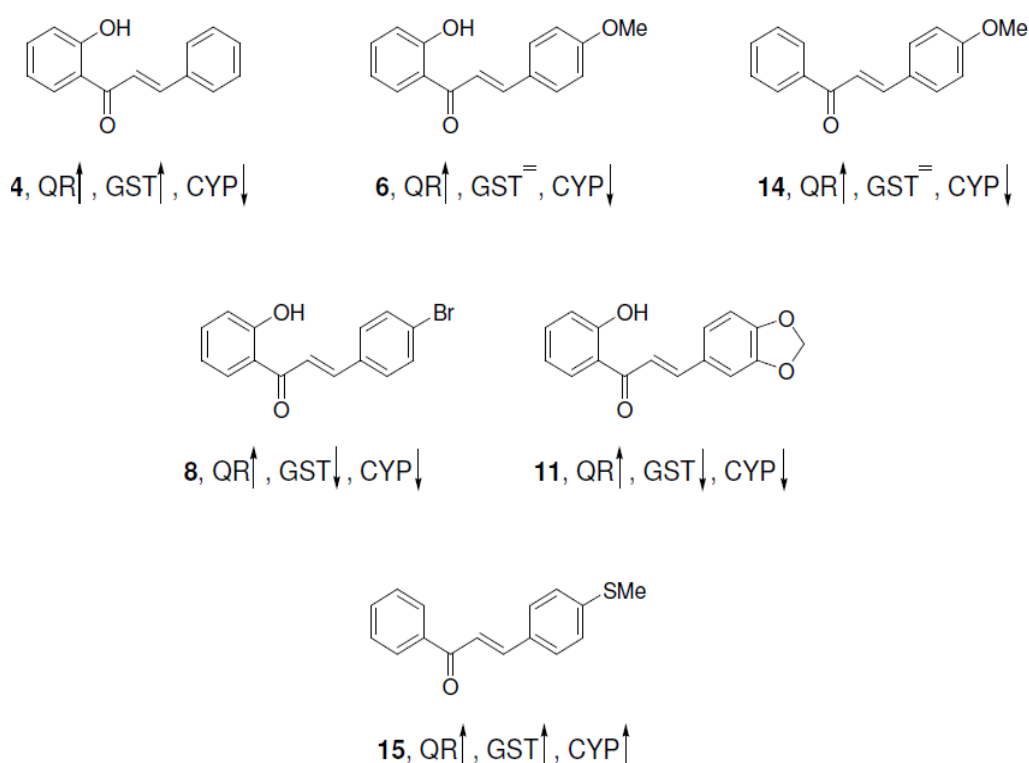


Figura 2.1- Chalconas estudiadas por nuestro grupo de trabajo (↑: indica incremento; ↓: indica disminución; = indica igualdad de niveles, de la enzima correspondiente, que en animales no tratados)⁵⁷.

Compuesto	Actividad Hepática (tratada/control)		
	QR	GST	
1	10.2	3.0	
2	2.7	1.9	
3	9.5	3.6	
4	10.8	2.9	
5	7.8	2.8	
6	8.4	2.7	
7	6.1	2.7	
8	7.3	2.4	
9	4.2	2.1	
10	5.4	2.3	
11	1.2	1.5	
12	3.7	1.8	
13	5.9	2.0	
14	5.1	1.3	
15	3.5	1.2	
16	20.8	4.4	
17	9.8	1.7	

Figura 2.2 – Inducción hepática *in vivo* de QR y GST por diferentes ditioltionas.

2.2 Objetivos

Objetivo general: Diseño, síntesis y elucidación estructural de nuevos compuestos híbridos ditioltiona-flavonoide como posibles inductores monofuncionales de enzimas de detoxificación de xenobióticos de fase II, potencial mecanismo quimiopreventivo para el cáncer.

Objetivos específicos:

- Diseño de agentes híbridos ditioltiona-flavonoides
- Síntesis de chalconas y derivados del heterociclo 1,2-ditiol-3-tiona
- Síntesis de agentes híbridos 1,2-ditiol-3-tiona-flavonoide
- Caracterización fisicoquímica de intermedios y entidades híbridas
- Evaluación en un modelo *in vitro* de los compuestos diseñados como moduladores de enzimas detoxificantes de fase II (QR y GST)

3. Resultados y discusión

3.1 Química

En el presente trabajo de tesina final de carrera se planteó como objetivo químico central, el diseño y síntesis de compuestos híbridos inductores de enzimas metabolizadoras de xenobióticos de fase II. Para ello, fueron diseñadas en una primera instancia dos grupos de compuestos precusores con funcionalidades farmacofóricas diferentes (*figura 3.1*). Por un lado, el diseño y síntesis de análogos de flavonoides naturales, más precisamente de compuestos tipo chalconas, del cual nuestro grupo de investigación ha venido trabajando⁵⁷. Por otro lado, se propuso el diseño y síntesis de varios derivados del sistema heterocíclico 3*H*-1,2-ditio-3-tiona. Una vez generado estos compuestos se continuó con el desarrollo de dos series de compuestos híbridos los cuales se obtuvieron a través de la hibridación molecular de los fragmentos de partida (*figura 3.1*). El motivo por el cual se generaron estas dos series de compuestos híbridos, fue la búsqueda de un sinergismo en la bioactividad inductora de enzimas de fase II.

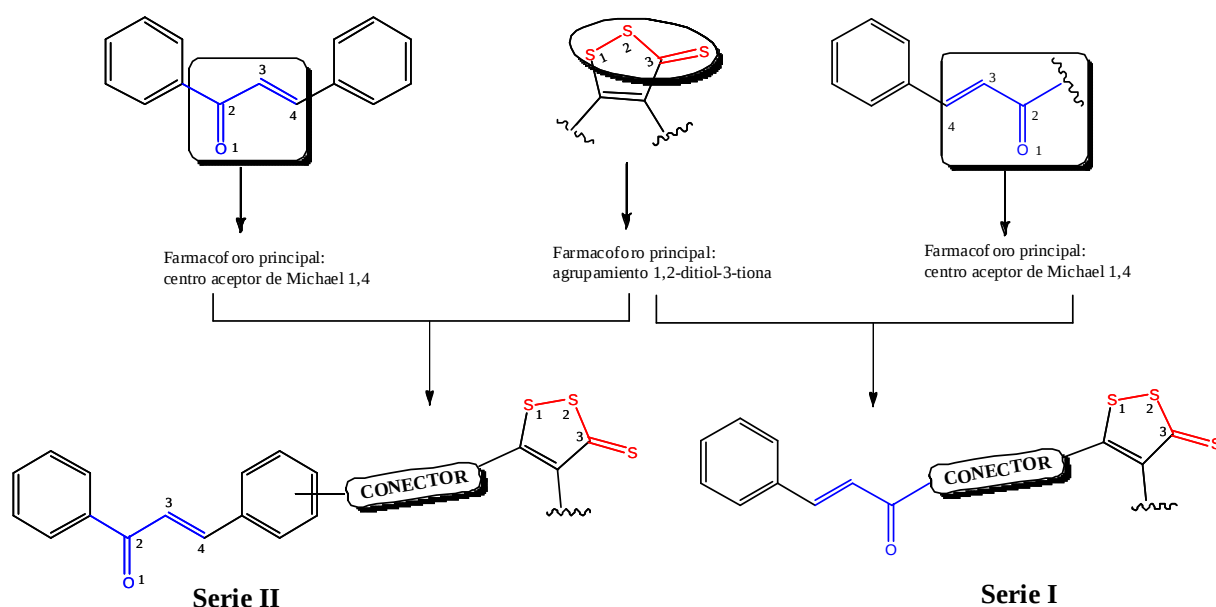


Figura 3.1 – Representación de las estructuras químicas generales de los precursores chalcona y ditioltiona y de las dos series de compuestos híbridos.

3.1.1 Síntesis y caracterización fisicoquímica de las chalconas de partida

Para la generación de las chalconas se propone una ruta sintética sencilla, en un único paso, la cual permite obtener el producto deseado con rendimientos de buenos a excelentes^{57,58}. La estructura de las dos chalconas de partida, **MMC01110** y **MMC01116**, así como la propuesta para el mecanismo general por el cual transcurre la reacción de obtención se representa en la *figura 3.2*.

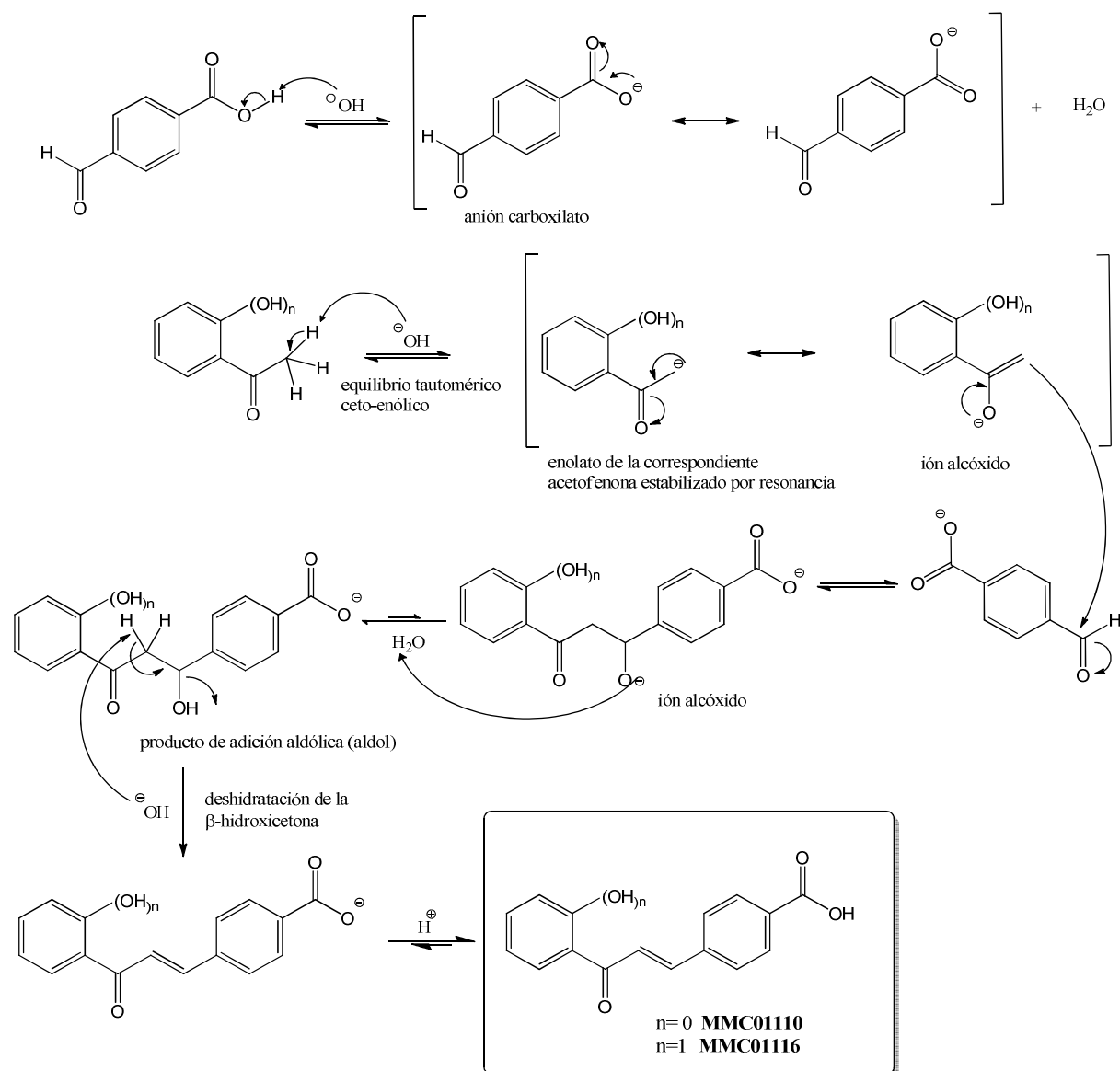


Figura 3.2 – Esquema del mecanismo de reacción correspondiente a la síntesis de las chalconas. Las etapas de la reacción comprenden: 1) formación del ión enolato, 2) ataque nucleofílico del enolato al carbono carbonílico del aldehído, 3) formación del producto de adición aldólica (aldol), 4) deshidratación del aldol.

La síntesis de ambas chalconas (con $n=0$ o con $n=1$) se lleva a cabo a través de una metodología sintética tradicional en química orgánica. En una primera instancia se adiciona la base (NaOH) en exceso a una solución de ácido 4-formilbenzoico en MeOH . Por último se procede al agregado de la correspondiente acetofenona al medio de reacción. Estos primeros pasos se realizan a temperatura ambiente. Luego, una vez corroborado por cromatografía en capa fina la presencia del producto de

adición aldólica, se procede a calentar la reacción para deshidratar el aldol y así obtener, el producto de condensación aldólica. El orden de agregado de los reactivos en este tipo de reacciones es muy importante para evitar la formación de productos secundarios indeseados, así como también el hecho de que el aldehído no posea protones con carácter ácido. Debido a que la densidad electrónica positiva del grupo carbonílico del aldehído es mayor, y a que, el impedimento estérico en el ataque nucleofílico y en el producto de adición generado es menor “atacando” al centro electrofílico del aldehído, no se observan productos secundarios de adición o condensación entre las correspondientes acetofenonas (*figura 3.3*).

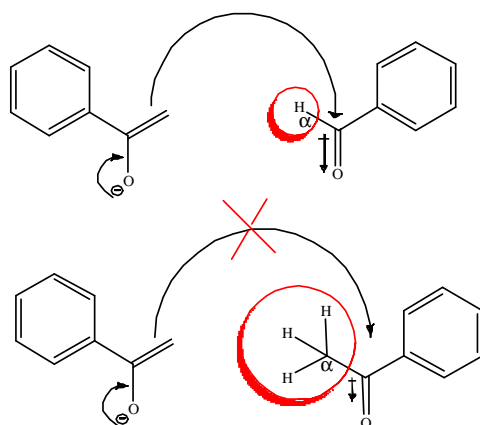


Figura 3.3 – Esquema del vector-momento dipolar de ambos grupos carbonílicos, así como el volumen de los sustituyentes en posición α al carbonilo.

En el transcurso de ambas reacciones se observó, mediante cromatografía en capa fina, la formación de un compuesto de polaridad intermedia, que podría asignarse a la dismutación del grupo aldehído sin protones en posición α al grupo carbonilo (producto de reacción de Cannizzaro, *figura 3.4*) y sería uno de los motivos por lo cual ambas reacciones no se completan en un 100 %.

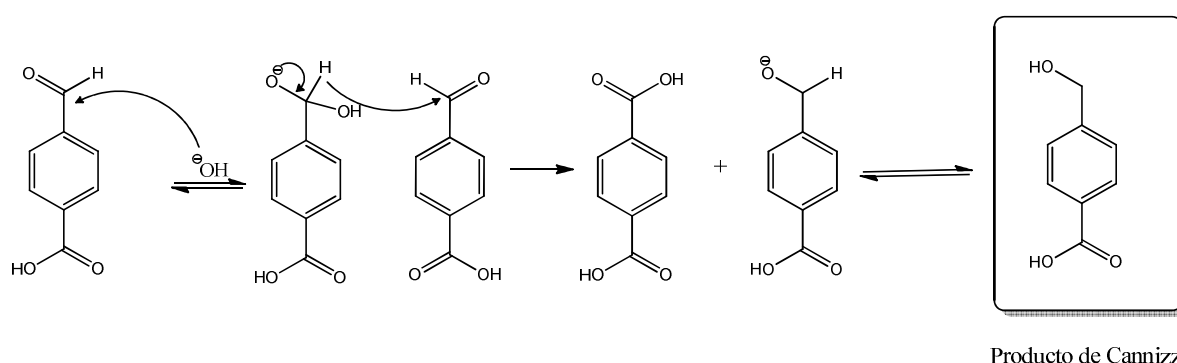
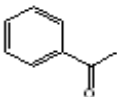
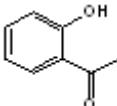


Figura 3.4 – Reacción de Cannizzaro que podría tener lugar con el aldehído de partida.

Los resultados obtenidos para las respectivas chalconas, indicando los tiempos y rendimientos de reacción se presentan en la *tabla 3.1*.

Tabla 3.1 – Resultados experimentales, tiempos de reacción y rendimientos, para la síntesis de las chalconas de partida

Código del producto	Acetofenona de partida	tiempo	Rendimientos (%)
MMC01110		4 h T.A ^a + 45min Rfl ^b	89
MMC01116		5 h T.A + 6 h Rfl	69

^a T.A: temperatura ambiente; ^b Rfl: calentamiento a reflujo.

Ambas chalconas fueron caracterizadas a través de propiedades físicas como por ejemplo, punto de fusión, y mediante elucidación estructural utilizando experimentos ¹H-RMN, ¹³C-RMN y espectrometría de masas. A continuación se discutirá la chalcona **MMC01110**, a modo de ejemplo, las diferentes señales presentes en el espectro ¹H-RMN, así como el patrón de fragmentación obtenido mediante inyección directa e impacto electrónico a 70 eV en la espectrometría de masas.

En el espectro de ¹H-RMN correspondiente a la chalcona **MMC01110** (figura 3.5), se puede obtener diversa información, como por ejemplo, 1) tipos de protones diferentes que están presente en la molécula; 2) número de protones de cada tipo; 3) entorno químico de los distintos protones, que se va a ver reflejado en el desplazamiento químico; y 4) relación existente entre los grupos de protones vecinos (desdoblamiento de las señales).

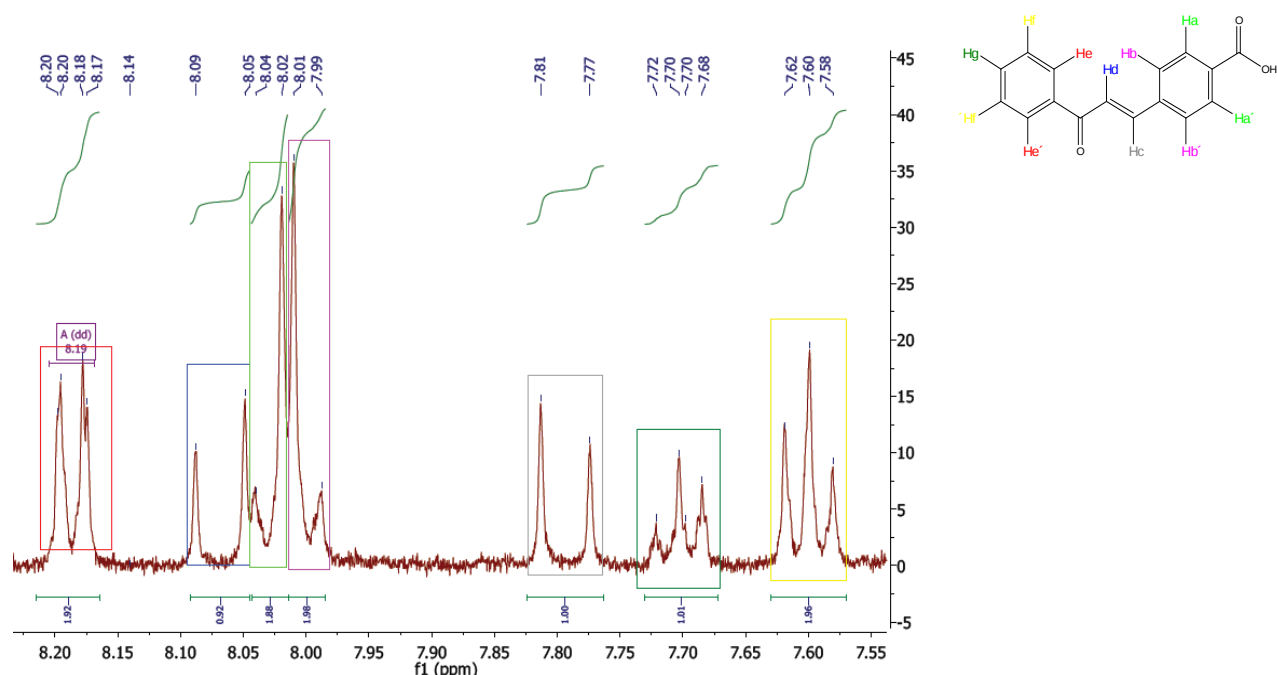


Figura 3.5 – Se muestra la región entre 7.55 y 8.20 ppm del espectro ^1H -RMN correspondiente a la chalcona **MMC01110** (estructura a la derecha del espectro) procesado con software MestReNova. Disolvente DMSO; temperatura de adquisición 22.16 °C.

Analizando la *figura 3.5*, la señal que aparece a mayor desplazamiento químico (resonancia a campos magnéticos menores) en la sección del espectro de ^1H -RMN mostrado, se corresponde con los protones aromáticos $\text{He}:\text{He}'$ (área de integración = 2). El desapantallamiento observado para este grupo de protones se debe a la presencia de un centro aceptor de Michael (grupo desblindante, grupo electrón atrayente y diamagnético) en la vecindad. Se puede observar que esta señal presenta una multiplicidad del tipo doblete de doblete (dd). En primera instancia se podría pensar que esa señal se desdoblaría en un doblete (d) dado que, He y He' tiene como “protones vecinos” a Hf y Hf' que son químicamente equivalentes. Lo que está ocurriendo es que existe un acoplamiento a distancia, característico en sistemas con electrones π -deslocalizados como es el caso de un sistema aromático, con el protón Hg ; generando el tipo de señal dd. Siguiendo con la elucidación estructural de esta chalcona, se observa en 8.07 ppm una señal del tipo doblete con un área de integración igual a 1. La constante de acoplamiento que presenta esta señal ($J_{dc}=15.6$ Hz) permite inferir que se trata de uno de los protones etenílicos y no de un protón aromático. Si bien no se realizaron experimentos NOEdiff para determinar la estereoisomería del doble enlace C-C, una J próxima a 15 Hz se corresponde con una configuración espacial del tipo *trans*. Esta señal se asigna al protón Hd , que por estar contigua al grupo carbonílico se encuentra desblindado y por tanto su desplazamiento químico es mayor que para el protón etenílico Hc . Las siguientes dos señales a 8.03 y 8.00 ppm, se corresponden con los protones aromáticos (4H) $\text{Ha}:\text{Ha}'$ y $\text{Hb}:\text{Hb}'$ respectivamente. Como se puede observar en el espectro, ambos dobletes tienen las intensidades de las señales distorsionadas (las intensidades no siguen la regla del triángulo de Pascal), se observan un incremento de las líneas internas a expensas del decremento de las externas, fenómeno conocido con el nombre vulgar de **efecto techo**. Dicho efecto es útil para aclarar hacia que zona del espectro están los protones con los que se acopla cada tipo de núcleo. Las constantes de acoplamientos H_{ab} y $\text{H}_{a'b'}$ oscilan entre 8.3 y 8.9 HZ respectivamente, lo que permite establecer que se está frente a un sistema aromático con sustitución 1,4 (sistema *para*-disustituido). Continuando con el análisis, en 7.79 ppm se presenta una señal con patrón de desdoblamiento de espin-espin del tipo doblete correspondiente al protón etenílico Hc . La constante de acoplamiento (J_{cd}) para este protón es de 15.7 Hz, confirmando que se trata del otro protón *trans*-olefínico, Hc . La siguiente señal, con integración relativa igual a 1, aparece en el entorno de 7.70 ppm, correspondiéndose con el protón Hg . La multiplicidad que presenta este protón es del tipo triplete de triplete, lo que confirma el acoplamiento con $\text{Hf}:\text{Hf}'$ y $\text{Hg}:\text{Hg}'$. La séptima y última señal que se observa en el espectro se corresponde con los protones aromáticos $\text{Hf}:\text{Hf}'$, con una integración igual a 2H. La multiplicidad respecto a estos dos protones es del tipo triplete, aunque se esperaba fuese un doblete de triplete pero que, en este experimento, no pudo resolverse.

Si bien no se muestran y discuten aquí los espectros de correlación homonuclear (COSY) y heteronuclear (a un enlace de distancia, HSQC, y a más de uno enlace de distancia, HMBC), los mismos fueron necesarios junto con el experimento de ^{13}C -RMN para una elucidación completa e inequívoca de la estructura de la molécula.

En la *figura 3.6* se presenta el espectro de masas para la chalcona **MMC01110** y se esquematiza el patrón de fragmentación, con los picos más relevantes.

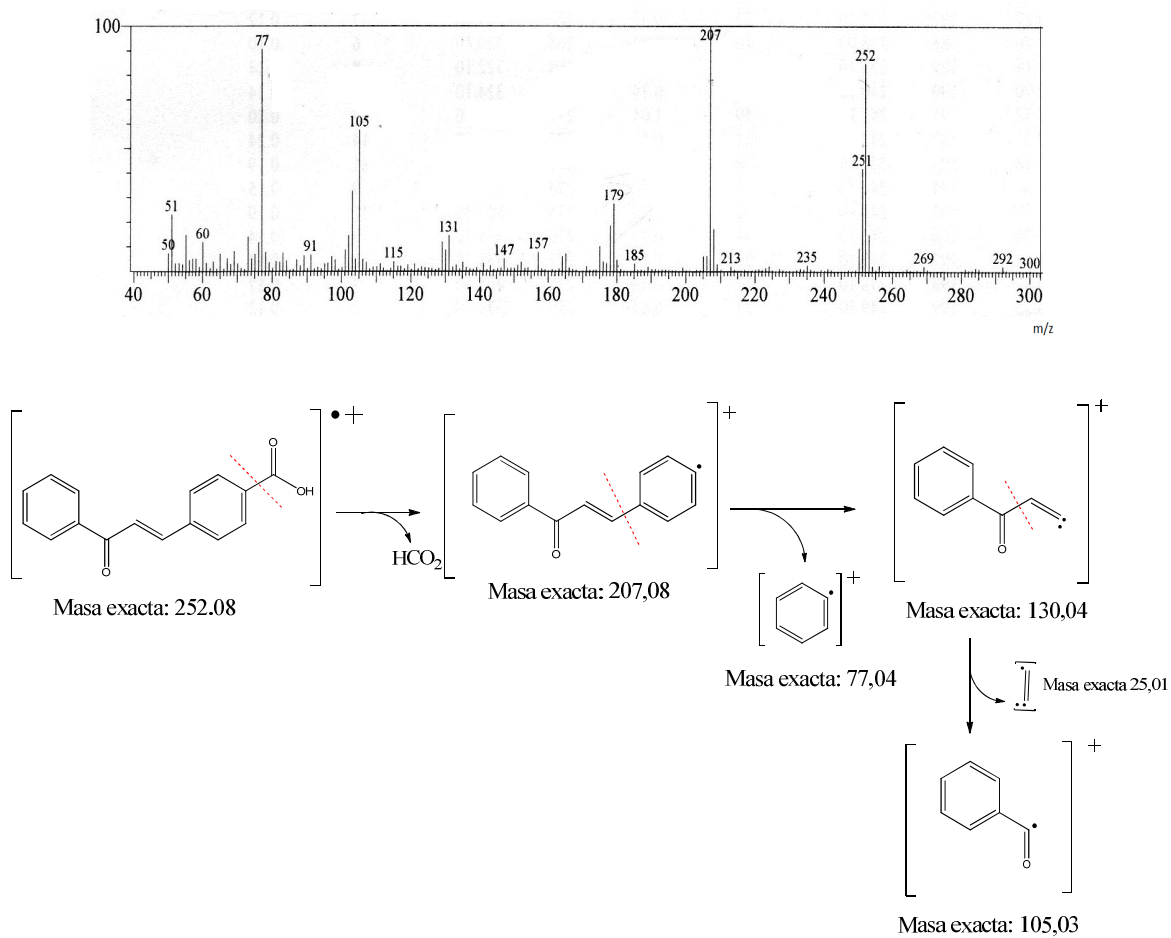


Figura 3.6 – Espectro de masas para la chalcona **MMC01110** y un posible patrón de fragmentación que explica los iones observados.

3.1.2 Síntesis y caracterización fisicoquímica de derivados del heterociclo 3H-1,2-ditio-3-tiona que permitirán generar los agentes híbridos

Para la preparación de ADT (figura 1.9, sección Introducción), que será utilizado como material de partida para la preparación de los agentes híbridos de este trabajo, se lleva a cabo inicialmente una metodología sintética descrita previamente por Li y colaboradores⁵⁹ (figura 3.7). En la misma se parte de anetol, tanto en su forma *trans*, como plantean Li y col., o como mezcla *cis-trans*, y azufre elemental en *N,N*-dimetilacetamida, generándose de esta forma el derivado **MMC01101** (ADT).

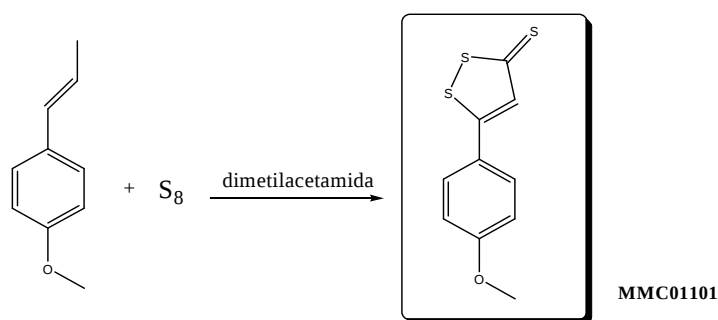


Figura 3.7 – Esquema sintético general de obtención del derivado **MMC01101**.

Dado que los rendimientos obtenidos utilizando esta metodología sintética convencional no fueron buenos (tabla 3.2), se procedió a ensayar la reacción en condiciones basadas en la aplicación de calentamiento por irradiación de microondas, para lo cual nuestro laboratorio cuenta con un equipo de microondas de funcionalidad multimodo, con el fin de mejorar el rendimiento y disminuir el tiempo de reacción (tabla 3.2).

Tabla 3.2 – Resultados experimentales en las diferentes síntesis ensayadas para la preparación de **MMC01101**.

Tipo de calentamiento	Condiciones	Purificación	Rendimientos (%)
convencional	360 min, 145 °C	recristalización (AE ^a)	17
microondas	12 min, 300 W, 195 °C	CC ^b en sílica	11

^a AE: acetato de etilo; ^b CC: purificación por cromatografía en columna.

Como se puede observar en la tabla 3.2 la utilización de radiación de microondas no produjo un aumento en el rendimiento pero si una notable reducción en el tiempo de reacción (30 veces menos). Debido a que esta pequeña variación en los rendimientos, no influía significativamente en los pasos siguientes de reacción, fue ésta última metodología la seleccionada para preparar en etapas posteriores el derivado **MMC01101**. No existen estudios mecanísticos que den cuenta de la formación de este tipo de heterociclo, sin embargo la obtención podría ser racionalizada como se presenta en la figura 3.8.

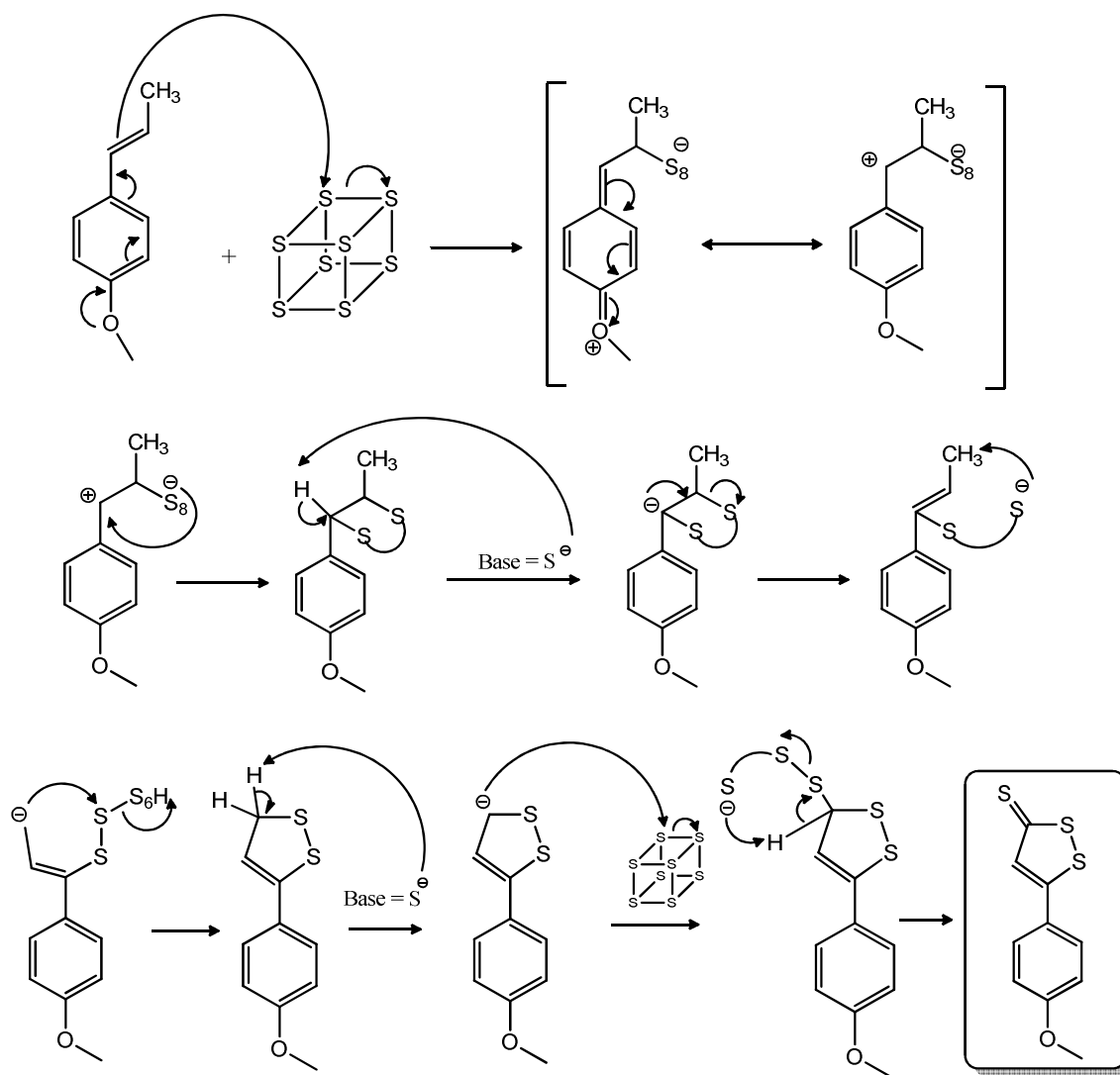


Figura 3.8 - Esquema del posible mecanismo para la obtención del derivado **MMC01101**.

El compuesto **MMC01101** fue caracterizado a través del punto de fusión y elucidado estructuralmente utilizando experimentos ¹H-RMN, ¹³C-RMN y espectrometría de masas. En la *figura 3.9* se presenta el espectro ¹H-RMN para dicho compuesto y se describe brevemente las señales allí presentes.

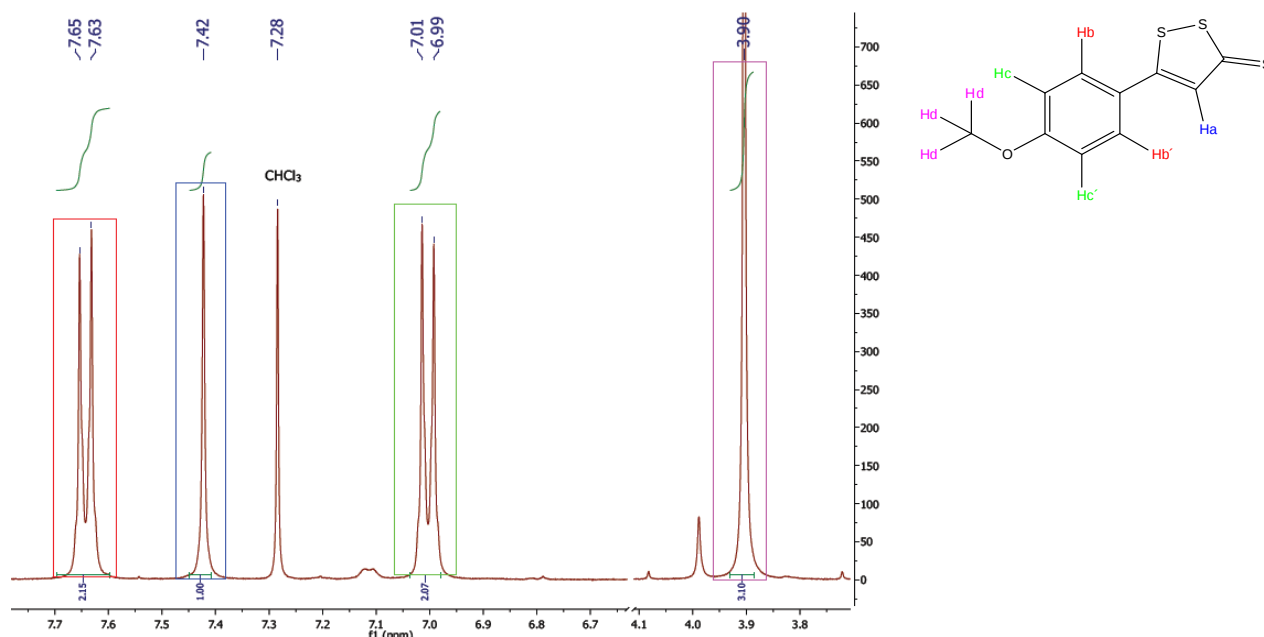


Figura 3.9 – Se muestra la región entre 7.70 y 3.80 ppm del espectro ^1H -RMN correspondiente a **MMC01101** (estructura a la derecha del espectro) procesado con software MestReNova. Disolvente CDCl_3 ; temperatura de adquisición 22.16°C .

La señal que aparece a mayor desplazamiento químico, 7.64 ppm, se corresponde con los protones aromáticos $\text{Hb}:\text{Hb}'$ (área de integración = 2). La diferencia en el desplazamiento químico con el resto de los protones se debe a la presencia de un centro aceptor de Michael ($\text{C}=\text{C}=\text{S}$) a 3 enlaces de distancia, que como se nombró anteriormente, este tipo de funcionalidades desblindan a los átomos adyacentes generando tal desplazamiento químico. La multiplicidad de espín para este conjunto de núcleos es del tipo doblete con una $J= 8.8$ Hz sugiriendo que se está frente a un sistema aromático con sustitución 1,4. La siguiente señal que se puede observar en el espectro se corresponde al protón del anillo heterocíclico y su desplazamiento químico es de 7.42 ppm característico de este tipo de sistemas. La señal se presenta como singlete debido a que no tiene la posibilidad de establecer acoplamiento escalar (a corta distancia) con protones vecinales. La siguiente señal (excluyendo las trazas de cloroformo) que se presenta en el espectro, es la correspondiente a los protones aromáticos $\text{Hc}:\text{Hc}'$, presentando un área de integración relativa de 2. La multiplicidad de espín para este conjunto de núcleo es de tipo doblete, con una $J= 8.8$ Hz. Se puede observar claramente el patrón del efecto techo entre ambos grupos de protones aromático corroborando el patrón de sustitución 1,4 presente en la molécula. La última señal observada en el espectro es la correspondiente a los protones del grupo metoxilo (área de integración=3). Debido a la cercanía con el átomo de oxígeno, la señal se observa a valores bajos de campo, lo que se traduce en valores altos de desplazamiento química comparado con protones metílicos no afectados por sustituyentes electrón-atrayentes. La señal tiene una multiplicidad del tipo singlete (no hay desdoblamiento) debido a que no presenta protones vecinos.

En la figura 3.10 se muestra el espectro de masas de **MMC01101** obtenido a través de espectrometría de masas de tipo TOF MS ES^+ . En la figura 3.11 se propone una ruta de fragmentación para dicho compuesto.

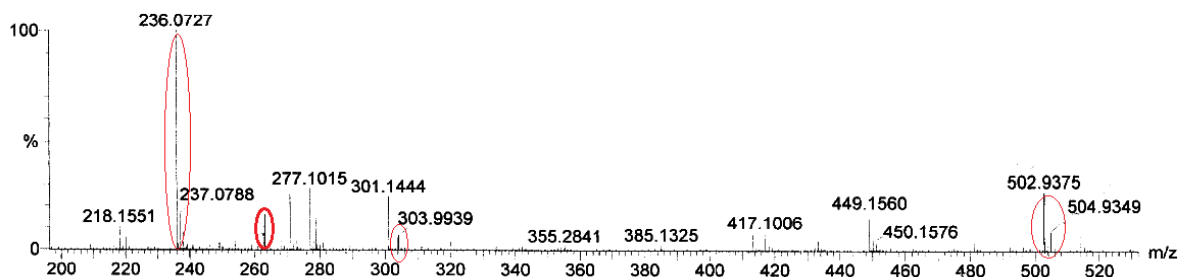


Figura 3.10 – Patrón de fragmentación obtenido para **MMC01101** en un experimento de TOF MS ES⁺.

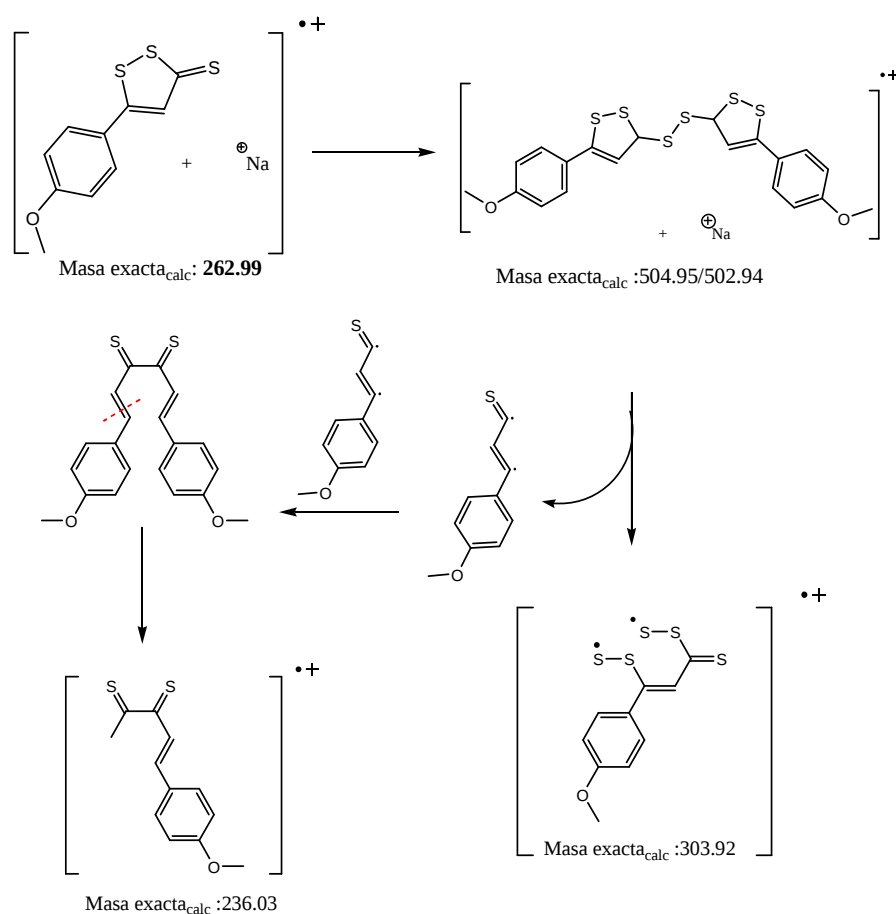


Figura 3.11 – Posibles fragmentaciones que dan cuenta del espectro de masas de la figura 3.10.

El derivado **MMC01101** debe contar con un sustituyente nucleofílico que permitirá generar los agentes híbridos deseados. Para la desprotección del grupo metoxilo, que daría lugar a dicho nucleófilo, presente en el derivado **MMC01101**, se utilizó inicialmente la metodología sintética propuesta por Li y colaboradores⁵⁹. La reacción se lleva a cabo en presencia de clorhidrato de piridinio en un medio libre de disolvente a 215 °C (figura 3.11).

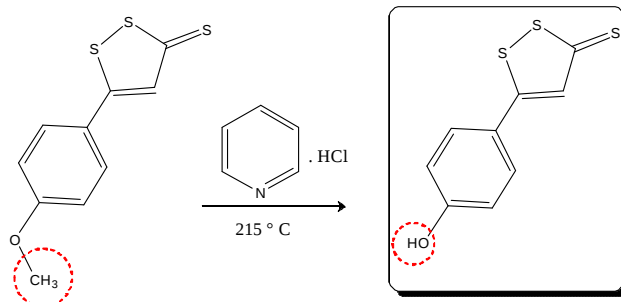


Figura 3.11 – Preparación del derivado **MMC01102** según Li y col.⁵⁹.

En dicha condición de reacción el producto de interés (**MMC01102**) se obtuvo con un rendimiento muy bajo (*tabla 3.3*). La elevada temperatura que exigía el proceso, llevó en algunas ocasiones a la aparición de productos de carbonización, dificultando el aislamiento (*work-up*) y la purificación del producto de interés, pudiendo ser también una de las causas del mal rendimiento. Por tal motivo, se planteó ensayar la reacción utilizando una metodología por calentamiento por irradiación de microondas, la cual está especialmente recomendada para reacciones de S_N , como es el caso de este proceso. Los resultados se presentan en la *tabla 3.3*.

Tabla 3.3 – Resultados experimentales en las diferentes síntesis ensayadas para la preparación de **MMC01102**.

Tipo de calentamiento	Condiciones	Purificación	Rendimientos (%)
convencional	25 min, 215 °C	CC en sílica	25
microondas	5 min, 300 W, 200 °C	CC en sílica	50-70

Como se puede observar en la *tabla 3.3* la utilización de radiación de microondas en esta instancia resultó en un notorio aumento del rendimiento de reacción (superior al 50%) y una disminución marcada en el tiempo de reacción (5 veces menos). Por tales motivos, la utilización de radiación microonda fue la metodología por excelencia para la preparación del derivado **MMC01102** en etapas posteriores.

El compuesto **MMC01102** fue caracterizado a través de propiedades físicas, punto de fusión, y elucidado estructuralmente utilizando experimentos ^1H -RMN, ^{13}C -RMN y espectrometría de masas. A modo ilustrativo se presenta el espectro de **MMC01102** (*figura 3.12*) señalando dos regiones características del espectro: por un lado la ausencia del grupo metoxilo en 3.99 ppm y la aparición de un singlete en 6.78 ppm correspondiente al protón fenólico.

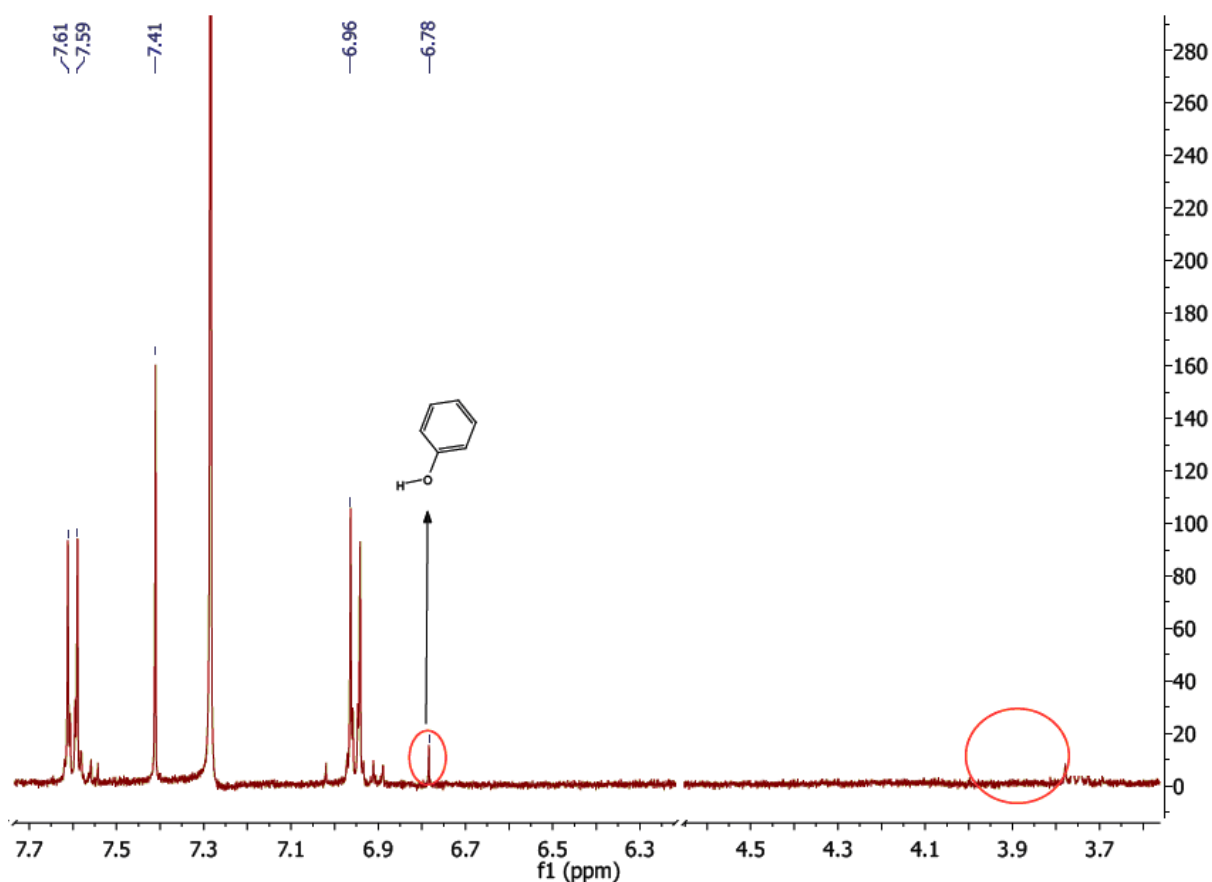


Figura 3.12 – Espectro de ^1H RMN de **MMC01102**. Se observan dos regiones características en este espectro: por un lado, la ausencia del singulete en 3.99 ppm correspondiente al grupo metoxilo, y por el otro, la aparición de un singulete en 6.78 ppm correspondiente al protón fenólico. Disolvente CDCl_3 ; temperatura de adquisición 22.16 °C.

Una vez obtenido el derivado **MMC01102**, se procedió a realizar modificaciones a nivel del grupo fenol, para generar entidades que, en etapas posteriores, produjesen fragmentos del tipo chalcona a través de reacciones de condensación aldólica (*figura 3.13*). Para ello, se ensayó en una primera instancia una reacción de sustitución nucleofílica entre **MMC01102** y α -cloroacetona, cuyo producto puede ser sustrato de una condensación aldólica posterior.

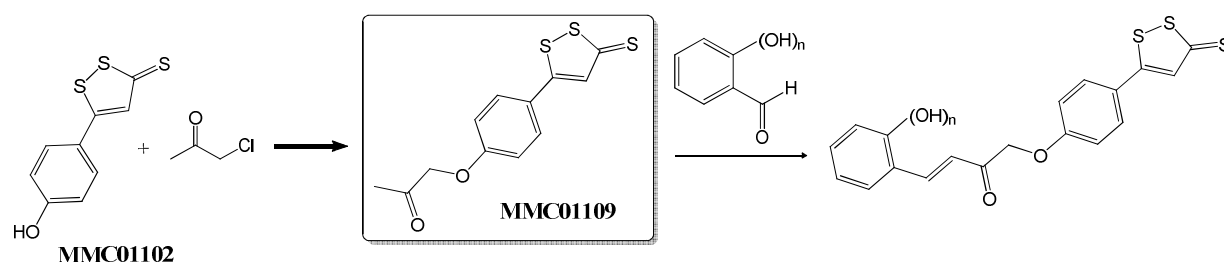


Figura 3.13 – Esquema sintético para la formación de **MMC01109** y el paso siguiente de reacción que conduce a la generación de la entidad híbrida ditioltiona-chalcona.

Cuando el derivado MMC01102 se sometió a condiciones de alquilación clásica⁶⁰, trabajando en un exceso de KI y de K₂CO₃, el resultado obtenido fue inesperado (figura 3.14). Sobre la base de datos espectroscópicos, ¹H-RMN, ¹³C-RMN, MS y junto con los estudios de difracción de rayos X (figura 3.15) se pudo elucidar sin ambigüedad el proceso que tuvo lugar.

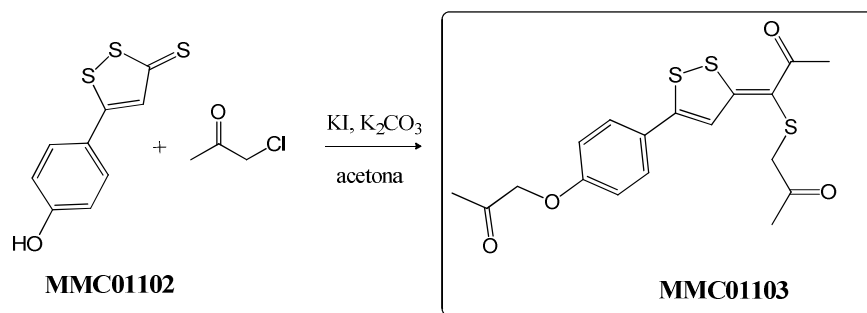


Figura 3.14 –Compuesto obtenido de la reacción entre **MMC01102** y α -cloroacetona en condiciones de alquilación clásica.

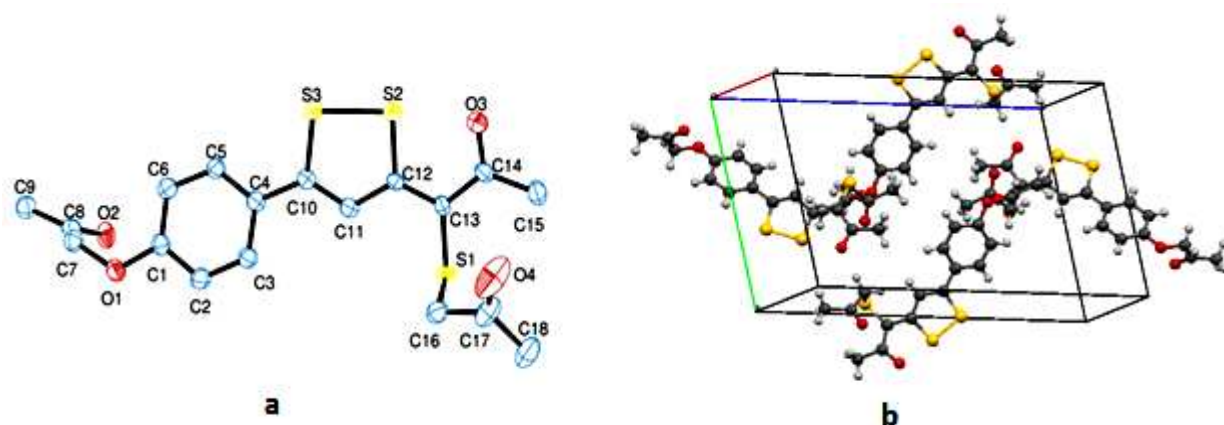


Figura 3.15 – (a) Diagrama ORTEP de la estructura generada en el experimento de difracción de rayos X del derivado **MMC01103**: se observa una disposición espacial *E* entorno al alqueno exocíclico. (b) Empaquetamiento molecular de la red cristalina en la celda unitaria.

Luego de haber elucidado por completo la estructura de **MMC01103**, se procedió a estudiar más detalladamente la reactividad del centro tiocarbonílico frente a grupos de enolatos diferentes a α -cloroacetona, y también a evaluar el comportamiento de la reacción en ausencia y presencia de KI, los resultados se presentan en la *tabla 3.4*.

Tabla 3.4 – Diferentes condiciones de reacción a las cuales se sometió **MMC01102** con el fin de estudiar la reactividad del tiocarbonilo.

Ensayo	KI	base	metilcetona	formación de MMC01103 ^a
1	17eq	K ₂ CO ₃ (17eq)	α -cloroacetona (1equiv)	+
2	17eq	K ₂ CO ₃ (17eq)	acetona (disolvente)	-
3	(-) ^b	NaH(1eq)	acetofenona (1equiv)	-
4	(-)	K ₂ CO ₃ (1eq)	α -cloroacetona (1equiv)	-

^a (-) significa ausencia de producto, (+) significa presencia de producto. ^b (-) significa ausencia de KI.

Los resultados presentados en la *tabla 3.4* muestran que, la incorporación de restos acetilos a la molécula de **MMC01103** apareció sólo en el caso en el que se utilizó α -cloroacetona y no para los otros enolatos en estudio (comparar entrada **1** con **2** y **3** en *tabla 3.4*). Por otro lado se puede observar que, la ausencia de KI en el medio de reacción no lleva a la formación de dicho producto (comparar entradas **1** y **4** en *tabla 3.4*). Estos resultados, junto con estudios teóricos llevados a cabo en paralelo, que tiene en cuenta la dureza, reactividad y energía de orbitales de frontera de los intermedios de reacción (resultados no mostrados en este trabajo) permiten explicar el mecanismo de formación de **MMC01103** como se muestra en la *figura 3.6*.

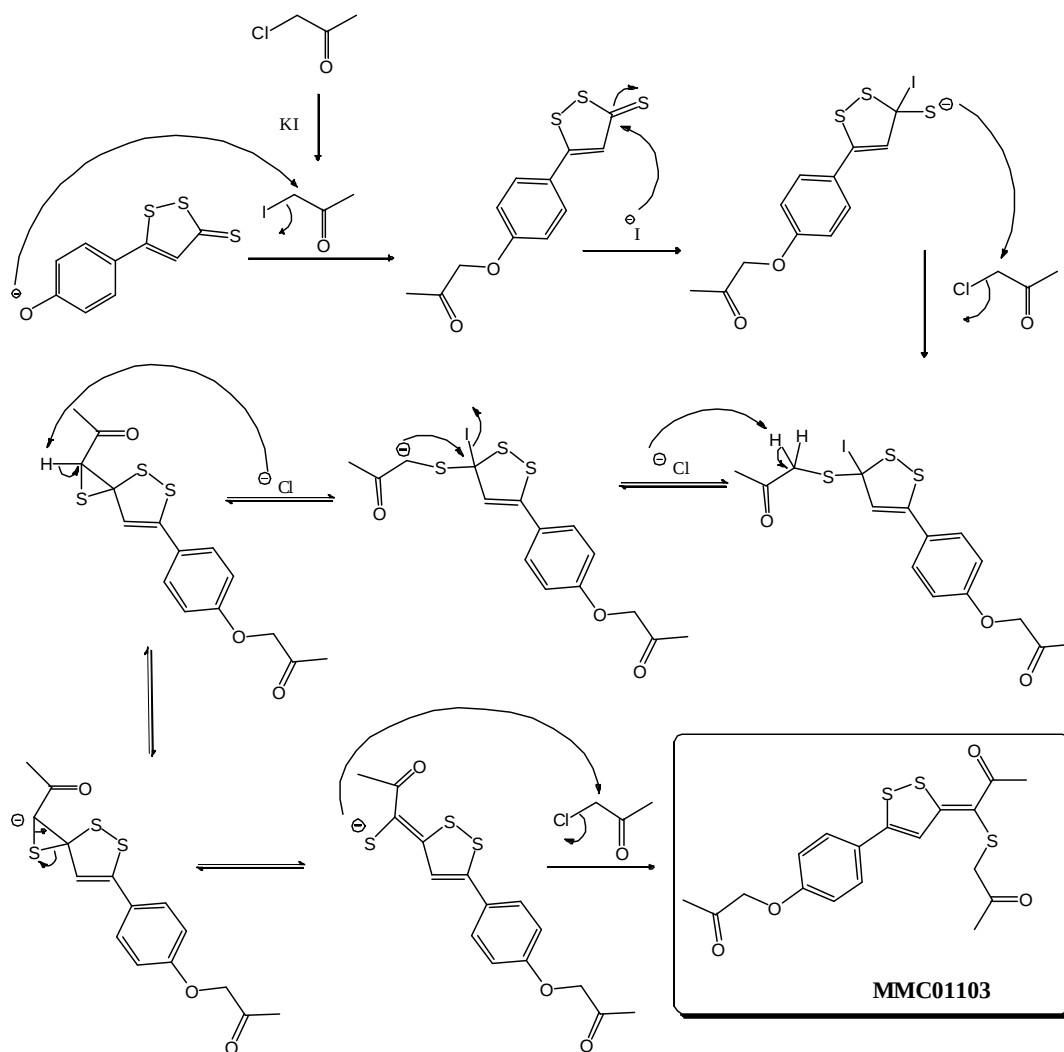


Figura 3.16 – Mecanismo de reacción propuesto para la formación del derivado **MMC01103**.

Como se comentará más adelante en la sección 2.2, el derivado **MMC01103** fue un muy buen inductor tanto de QR como de GST. Estos resultados alentadores llevaron a seguir profundizando en este paso de reacción; como por ejemplo: se evaluó la generación de dicho producto utilizando energía de radiación de microondas, los resultados se presentan en la *tabla 3.5*.

Tabla 3.5 – Condiciones ensayadas y resultados obtenidos en la síntesis de **MMC01103**.

Tipo de calentamiento	Condiciones	Purificación	Rendimiento (%)
convencional	180 min, 56 °C	CC en sílica y recristalización de fracciones aisladas	54
microondas	80 s, 100 W, 60 °C	CC en sílica y recristalización de fracciones aisladas	82

Nuevamente la utilización de la radiación de microondas, como fuente de energía, resultó en una mejora extraordinaria en el tiempo y en el rendimiento de reacción, siendo otra vez la metodología seleccionada para la preparación de dicho derivado en instancias posteriores.

Una vez terminado con la evaluación de las condiciones de preparación de **MMC01103** se retomó el estudio de las condiciones de formación del derivado **MMC01109** (figura 3.13). Según la hipótesis planteada para el mecanismo de generación de **MMC01103**, el anión ioduro estaría siendo un factor importante en dicha reacción, por tal motivo, la exclusión de KI del medio de reacción fue una de las condiciones que se modificó inicialmente (tabla 3.6).

Tabla 3.6 - Condiciones ensayadas para la preparación de **MMC01109**.

Intentos	Reactivos	Condiciones	Rendimiento (%)
1	MMC01102(1eq), α -cloroacetona(1eq), K_2CO_3 (1eq), 18-c-6(1eq), Cat T ^a	T.A; 72 h	45
2	Idem a 1	T.A; 72 h + 4 h Rfl	11
3	Idem a 1 (escalado 4x)	T.A, 72 h	18
4	MMC01102(1eq), α -cloroacetona(3eq), K_2CO_3 (1eq), 18-c-6(1eq), Cat T, (escalado 2x)	T.A, 72 h	15
5	Idem a 1	200 W, 17 min, 60°C	(-) ^b

^a Cat T = catalizador de transferencia de fase (cloruro de alquilbencildimetilamonio); ^b (-) = ausencia de producto.

Como se puede observar en la *tabla 3.6*, la ausencia de KI no sólo resultó en la formación del producto de interés sino que también evitó la generación de productos secundarios, entre ellos **MMC01103** (ver *tabla 3.4*). Una vez establecidas las condiciones de reacción que conducían a la formación de **MMC01109**, se trató de modificar algunos parámetros del medio con el objetivo de incrementar el rendimiento y acortar el tiempo de reacción. La única condición de reacción que no condujo a la formación de dicho producto fue la utilización de energía de microondas (intento 5, *tabla 3.6*), generando al cabo de 17 minutos, descomposición del reactivo (corroborado por cromatografía en capa fina). Las condiciones de reacción que generaron el producto de interés con mejor rendimiento fueron las que se utilizaron en el intento 1. En el intento 2, la reacción se sometió a reflujo, Rfl, por un período de 4 horas, resultando en un decremento notorio en el rendimiento de reacción. En el intento 3 se utilizaron las mismas relaciones molares que en el intento 1 pero escalando 4 veces y tampoco se logró una mejora en el rendimiento. En el intento 4, se realizó un escalado de 2 veces de las condiciones del intento 1 y se agregó un exceso de cloroacetona; estas modificaciones tampoco llevaron a una mejora en el rendimiento de reacción.

Uno de las causas que podría estar explicando los bajos rendimientos de esta reacción sería la baja reactividad que posee el anión fenolato al ser un sistema estabilizado por resonancia con su forma tiolato (*figura 3.17*). Otro motivo, como se describe a continuación, puede ser la facilidad con que **MMC01109** pierde el grupo metilcarbonilmetilo en presencia de nucleófilos.

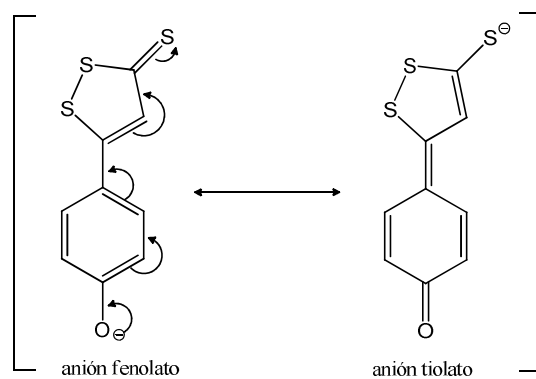


Figura 3.17 – Deslocalización de la carga negativa del nucleófilo fenolato de **MMC01102**.

3.1.3 Síntesis y caracterización de agentes híbridos ditioltiona-chalcona (serie I)

Para la formación del compuesto híbrido mostrado en la *figura 3.13*, a partir de **MMC01109**, se procedió a realizar la reacción de condensación aldólica entre el resto metilcetona de éste y derivados de benzaldehído (*figura 3.18*).

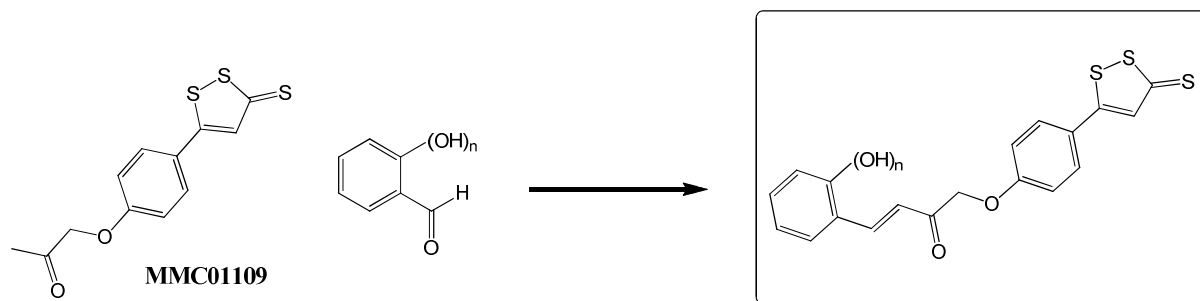


Figura 3.18 – Esquema sintético general para la formación del compuesto híbrido resultado de la condensación aldólica entre **MMC01109** y derivados de benzaldehído.

En la *tabla 3.7* se presentan las condiciones de reacción ensayadas y los resultados obtenidos durante el intento de formación de dicho híbrido.

Tabla 3.7– Condiciones ensayadas para la obtención del híbrido resultado de la condensación aldólica entre **MMC01109** y benzaldehído.

Intentos	Reactivos	Condiciones	Resultados ^a
1	K ₂ CO ₃ (1eq), 18-c-6(1eq)	T.A, 72 h	(-)
2	K ₂ CO ₃ (1eq), 18-c-6(1eq)	Rfl, 12 h	(-)
3	KOH(1eq), 18-c-6(1eq)	T.A, 3 h	(-)
4	KOH(1eq), 18-c-6(1eq)	Rfl, 4 h	MMC01102

^a (-): hace referencia a la ausencia de productos visualizados por cromatografía en capa fina.

Como se puede observar en la *tabla 3.7*, ninguna de las condiciones ensayadas resultó en la formación del híbrido deseado. De hecho, el uso de KOH en reflujo de metanol (intento **4**) llevó a la apertura del éter (debido a la gran estabilidad del grupo saliente), dando como resultado el derivado **MMC01102**, (*figura 3.19*).

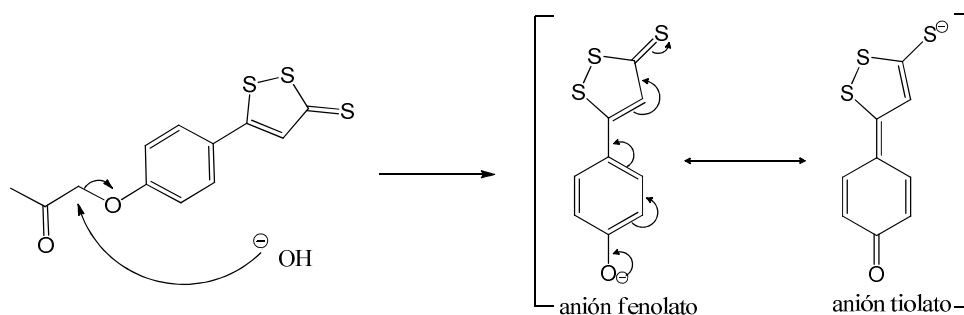


Figura 3.19 – Propuesta de apertura del éter de MMC01109 que da cuenta de la formación de **MMC01102** en esta reacción. El proceso se ve favorecido por el comportamiento de buen grupo saliente del fenolato de **MMC01102**.

Ante estos resultados poco alentadores no se realizaron esfuerzos posteriores para generar agentes híbridos a través de reacciones de condensación aldólica.

Con el objetivo de generar alguna estructura híbrida representativa de la serie I (*figura 3.1*) se decidió utilizar una estrategia sintética diferente a la mencionada anteriormente. Para ello, se partió de un ácido de origen natural que posee en su estructura un sistema 1,4-Michael, el ácido cinámico. Para la preparación del nuevo agente híbrido diseñado se utilizó una ruta sintética sencilla, en un único paso (*figura 3.20*). Las condiciones ensayadas (*tabla 2.8*) condujeron al producto de interés con muy buen rendimientos.

Si bien el producto de reacción generado tras el acople no presenta el fragmento propio de una chalcona (C6-C3-C6), el mismo cumple con la incorporación del farmacóforo central presentes en ellas (centro aceptor de Michael) conservando dos sistemas aromáticos A y B de las chalconas, separados en este caso por tres átomos de carbono y uno de oxígeno (C6-C3-O-C6) y el segundo farmacóforo, el heterociclo ditioltiona.

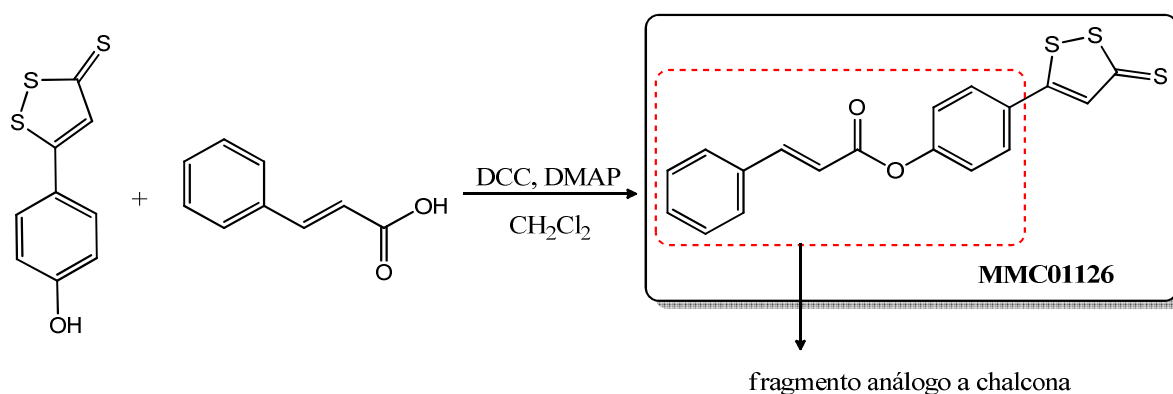


Figura 3.20– Esquema para la obtención del híbrido **MMC01126**.

Tabla 3.8 – Resultados experimentales de la síntesis de **MMC01126**.

Producto	Tiempo (horas)	Purificación	Rendimiento (%)
MMC01126	8	CC en sílica	80

La estructura del derivado **MMC01126** fue confirmada combinando varias técnicas espectroscópicas, ^1H -RMN, ^{13}C -RMN, mediante espectros de correlación homo (COSY) y heteronuclear (HSQC y HMBC) y a través de espectrometría de masas.

3.1.4 Síntesis y caracterización de agentes híbridos ditioltiona-chalcona (serie II)

Una vez obtenido los derivados **MMC01102**, **MMC01110** y **MMC01116** se procedió a generar los correspondientes agentes híbridos según se muestra en la *figura 3.21*.

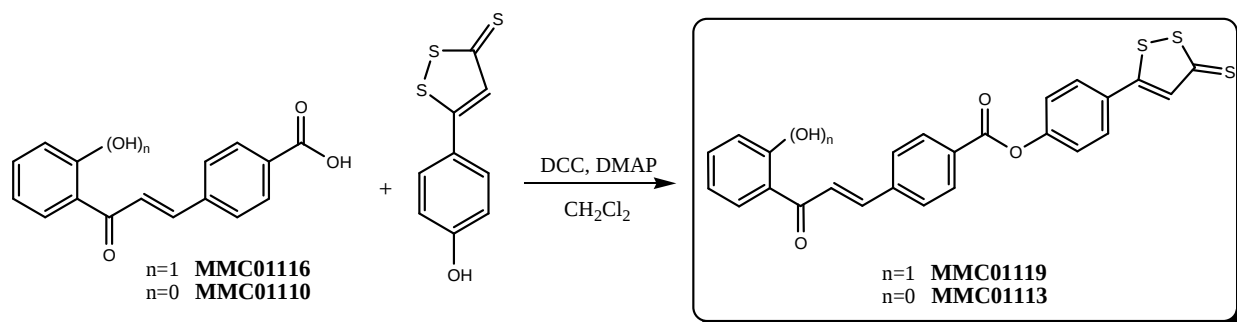


Figura 3.21– Esquema sintético general de obtención de los híbridos **MMC01113** y **MMC01119**.

Para la obtención de estos compuestos híbridos se propone una ruta sintética sencilla, que involucra un único paso de reacción, la que permite obtener los productos de interés con rendimientos de moderados a buenos (*tabla 3.9*). Para esta reacción se utilizan condiciones de esterificación de Steglich⁶¹. Estas reacciones de acople dependen de la alta eficiencia de la 4-dimetilaminopiridina (DMAP) como catalizador nucleofílico en el momento de la transferencia de ambos grupos. La reacción de esterificación procede sin la necesidad de un derivado de ácido carboxílico activado presintetizado, a temperatura ambiente y en un medio de reacción levemente básico. En la *figura 3.22* se esquematiza el mecanismo de esterificación de Steglich.

Tabla 3.8 – Resultados experimentales de la síntesis de **MMC01113** y **MMC01119**.

Producto	Tiempo (horas)	Purificación	Rendimientos (%)
MMC01113	6	CC en sílica	24
MMC01119	48	CC en alúmina	6

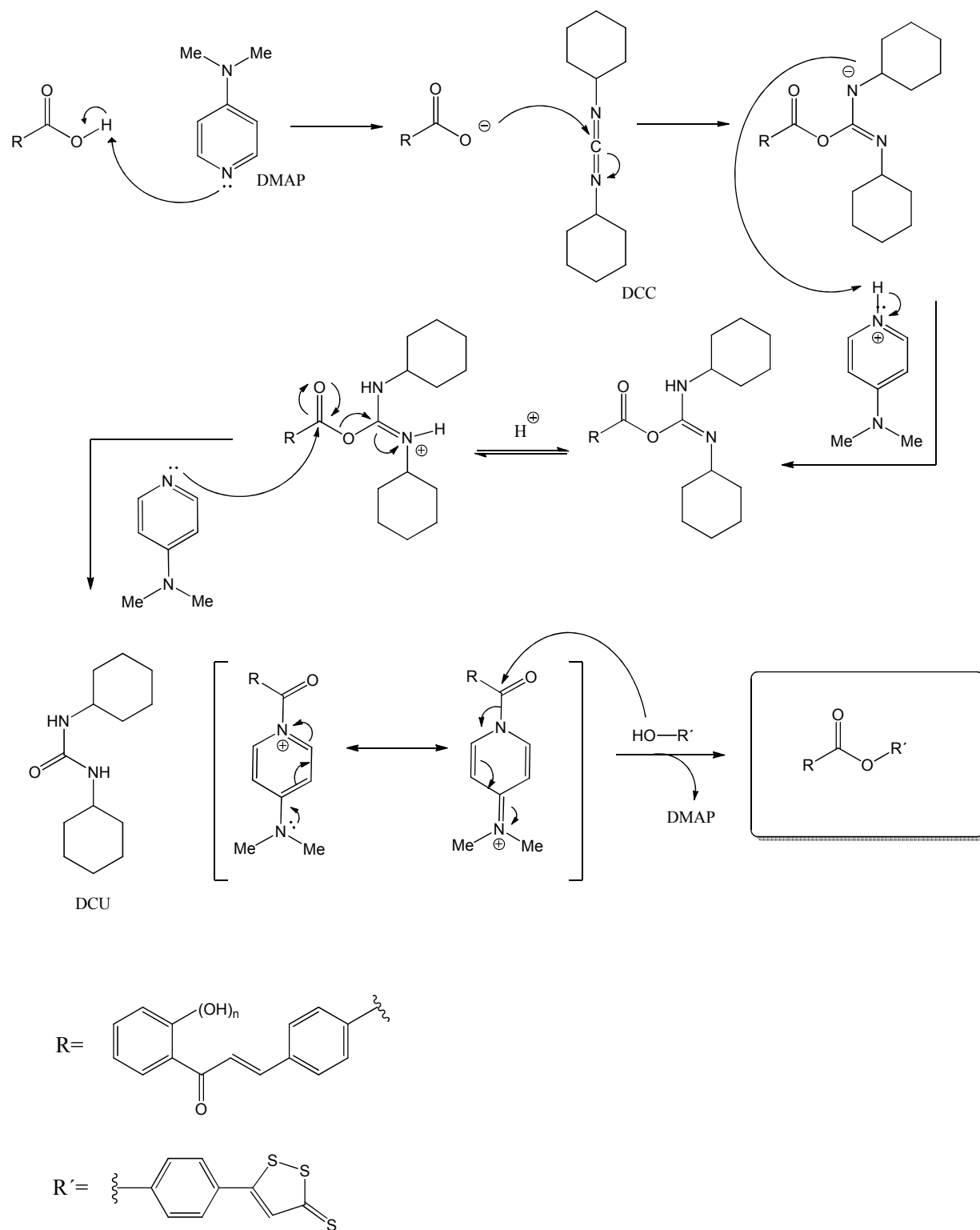


Figura 3.22– Mecanismo de esterificación de Steglich.

La elucidación estructural de ambos híbridos se realizó combinando varias técnicas espectroscópicas, 1H -RMN, ^{13}C -RMN, mediante espectros de correlación homo (COSY) y heteronuclear (HSQC y HMBC) y a través de espectrometría de masas. A continuación se presentan los espectros de 1H -RMN, ^{13}C -RMN, COSY, HSQC y HMBC para el híbrido **MMC01113** y se discuten las principales señales presentes en cada uno de ellos.

En la *figura 3.23* se presenta el espectro ^1H -RMN de la molécula híbrida identificando los 16 protones presentes en ella con diferentes colores.

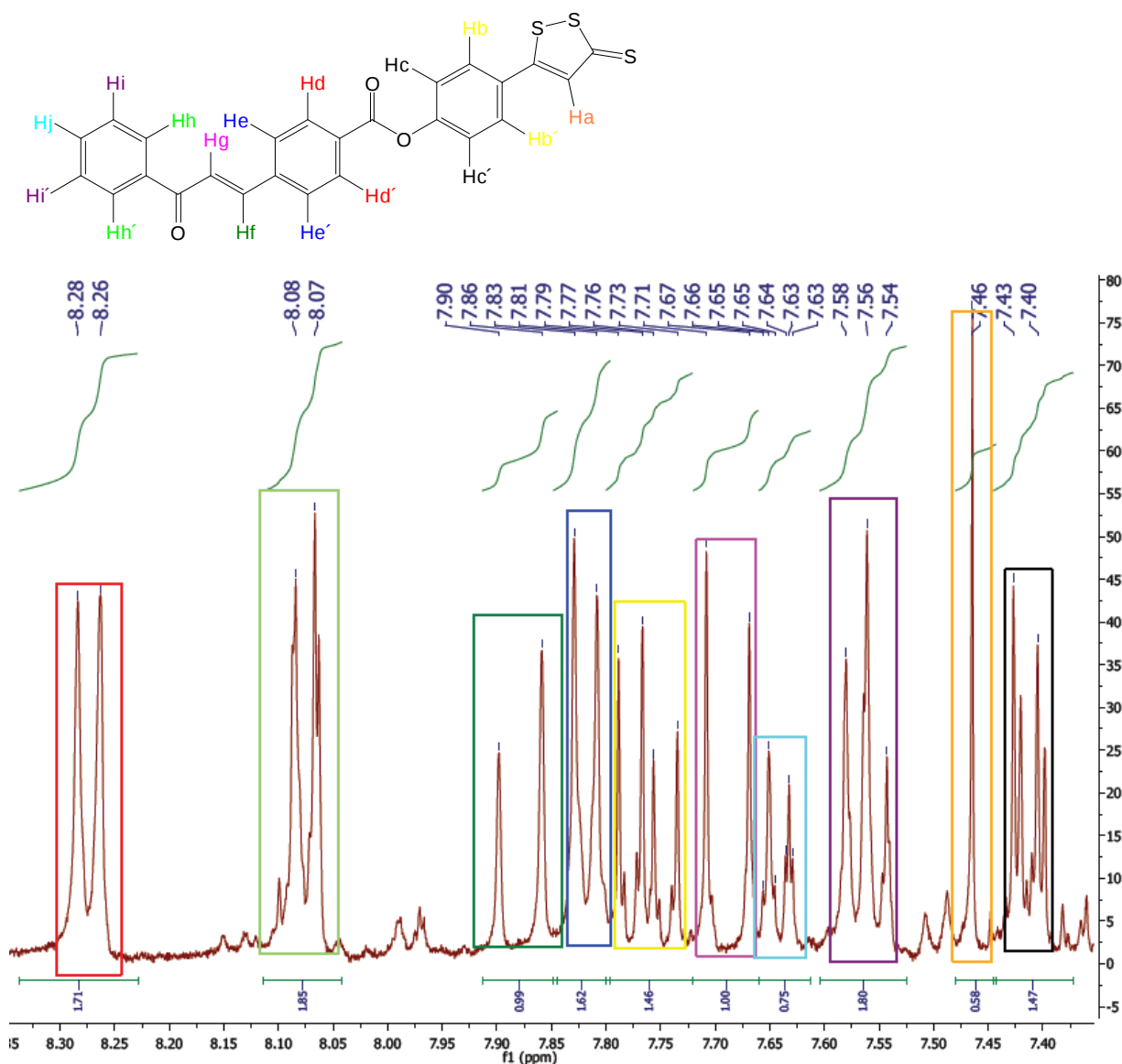


Figura 3.23 – Se muestra la región entre 7.39 y 8.30 ppm del híbrido **MMC01113** indicando cada grupo de protones con un color específico. Disolvente CDCl_3 ; temperatura de adquisición 22.16 °C.

Se puede observar en la *figura 3.23* que, entre 7.39 y 8.30 ppm aparecen todas las señales correspondientes a los protones presentes en la molécula híbrida **MMC01113**. A modo de ejemplo se describirán algunas señales características de la misma que permiten confirmar que la hibridación molecular resultó ser eficiente. Una de estas señales es la correspondiente al protón Ha del fragmento ditioltion. En **MMC01102** este protón presenta un desplazamiento a 7.41 ppm, ahora bien, cuando está formando parte del híbrido se encuentra desplazado hacia campos menores (desplazamientos químicos mayores) tomando un valor de 7.46 ppm. La diferencia de desplazamiento químico en ambas situaciones se podría adjudicar a que, en el caso de **MMC01102**, cuando el grupo OH del fenol está libre, la resonancia del oxígeno termina con la incorporación de una carga negativa en el carbono que soporta a Ha y por ende este protón está blindado. Cuando el OH fenólico pasa a formar parte del grupo éster en **MMC01113**, ese oxígeno también tiene la posibilidad de resonar hacia el grupo carbonílico,

“minimizando” la capacidad de ceder electrones hacia el carbono que soporta Ha y por ende desblindando su entorno, ver figura 3.24.

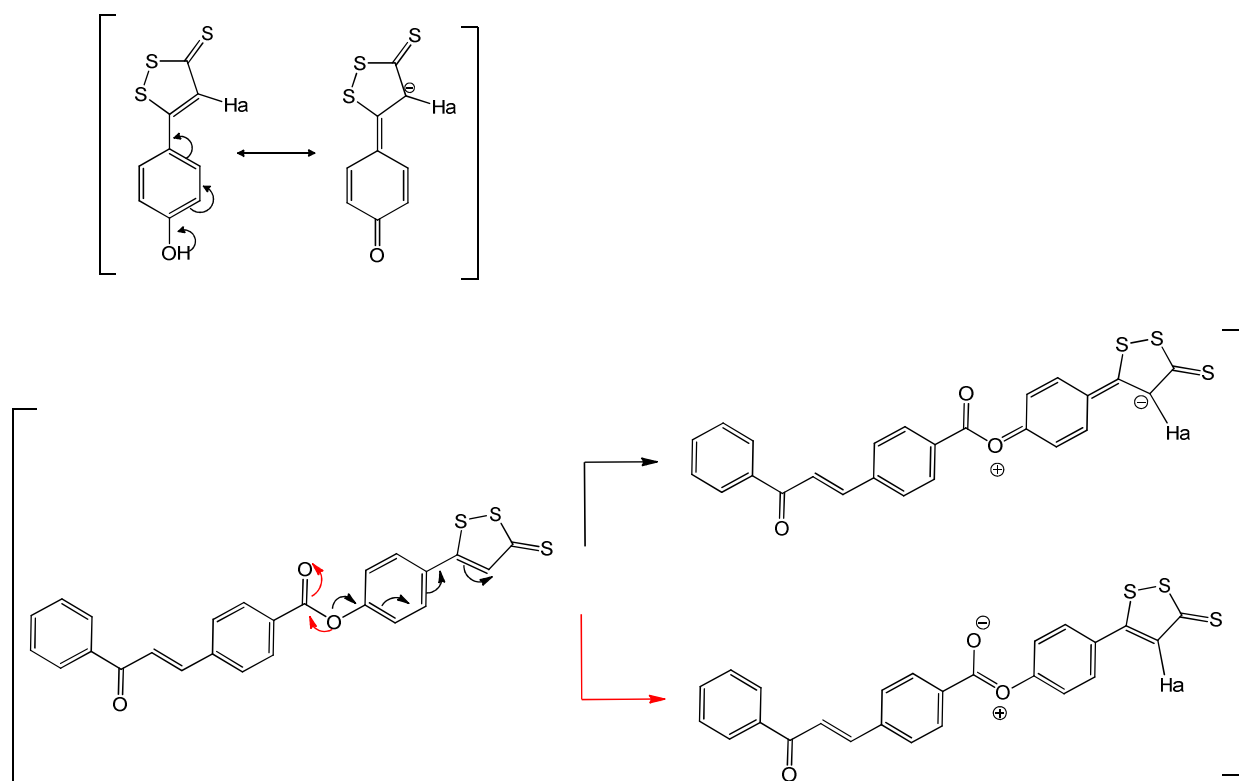


Figura 3.24– Formas resonantes de **MMC01102** y **MMC01113** para explicar la diferencia de desplazamiento químico en el protón heterocíclico Ha.

Por otro lado, la identificación de los protones etenílicos estaría siendo un indicativo de la presencia del fragmento chalcona en el híbrido. Eso es así, ya que en 7.88 (Hf) y en 7.69 (Hg) aparecen dos señales con multiplicidad de spin-spin de tipo doblete con constantes de acoplamiento de 15.8 y 15.7 Hz respectivamente. Para la caracterización completa de la molécula se recurrió a otros experimentos espectroscópicos que se van a explicar a continuación.

En la figura 3.25 se presenta el espectro de correlación homonuclear (COSY) ^1H - ^1H que permite identificar inequívocamente el acoplamiento escalar protón-protón. En este caso por tratarse de un sistema poliaromático la utilización de esta herramienta permitió la asignación de dichos protones en la molécula de estudio. En este tipo de espectros de 2D las señales que toman importancia son las que se encuentran fuera de la diagonal ya que estas son las que resultan de la interacción de espines distintos que están acoplados de forma escalar. Las señales sobre la diagonal son irrelevantes ya que son el resultado de la interacción de espines iguales.

Los círculos dibujados en el espectro (fuera de la diagonal) permiten una mejor visualización del acoplamiento escalar protón-protón. A modo de ejemplo, el círculo azul señala el acoplamiento escalar entre Hc:Hb y Hc':Hb' que por encontrarse a un enlace de distancia deben aparecer correlacionados en el experimento de correlación homonuclear (COSY). El círculo verde señala el acoplamiento escalar entre los protones Hd:He y Hd':He'.

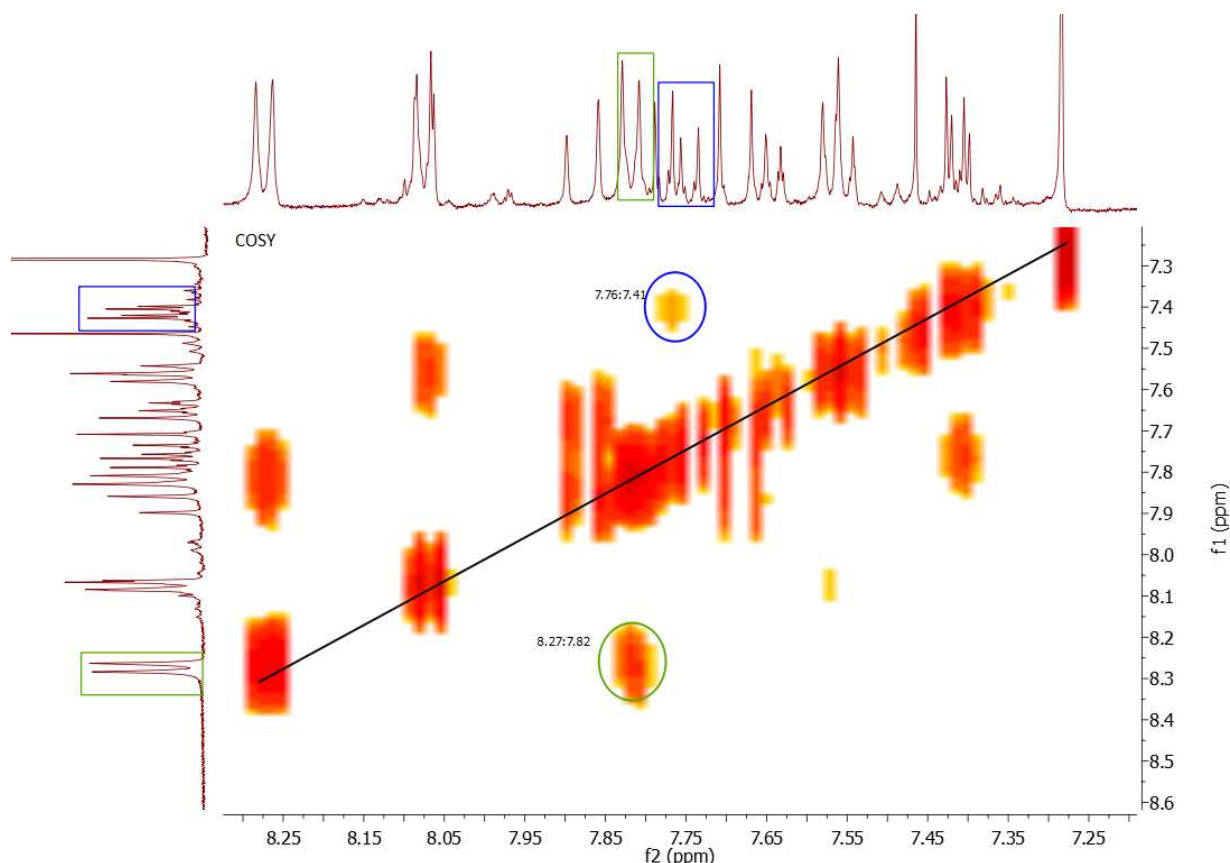


Figura 3.25– Espectro COSY de **MMC01113**. Los círculos indican el acoplamiento escalar entre núcleos vecinos aromáticos.

En la *figura 3.26* se muestra el espectro correspondiente al experimento de correlación heteronuclear HSQC. En este tipo de espectros se puede apreciar claramente la correlación bidimensional de cada tipo de protón con su correspondiente carbono en la molécula (correlación H-C a un enlace). En la actualidad este tipo de experimento se lleva a cabo mediante detección inversa; se detecta la señal del heteronúcleo (^{13}C en este caso en particular) a través del protón que es más sensible y con mayor abundancia isotópica en la muestra (99.98 de ^1H vs 1.11 de ^{13}C), es decir, se excita al heteronúcleo y éste le transmite la magnetización al ^1H y el equipo lo detecta. A modo de ejemplo se muestran en la *figura 3.26* la correlación de los protones etenílicos con sus respectivos carbonos. El círculo azul se corresponde con la correlación heteronuclear a un enlace del protón etenílico Hg y el carbono al que está enlazado. El círculo verde se corresponde con el protón etenílico Hf y el carbono al que está enlazado. Otra señal característica en este espectro la presenta el protón heterocíclico Ha y el carbono al que está enlazado, esta señal está indicada con un círculo amarillo. Las restantes correlaciones $^1\text{H}:$ ^{13}C presentes en esta molécula se corresponden con protones y carbonos aromáticos entre 125 y 135 ppm y no van a ser descritos en esta instancia (ver sección 5.1.2.3).

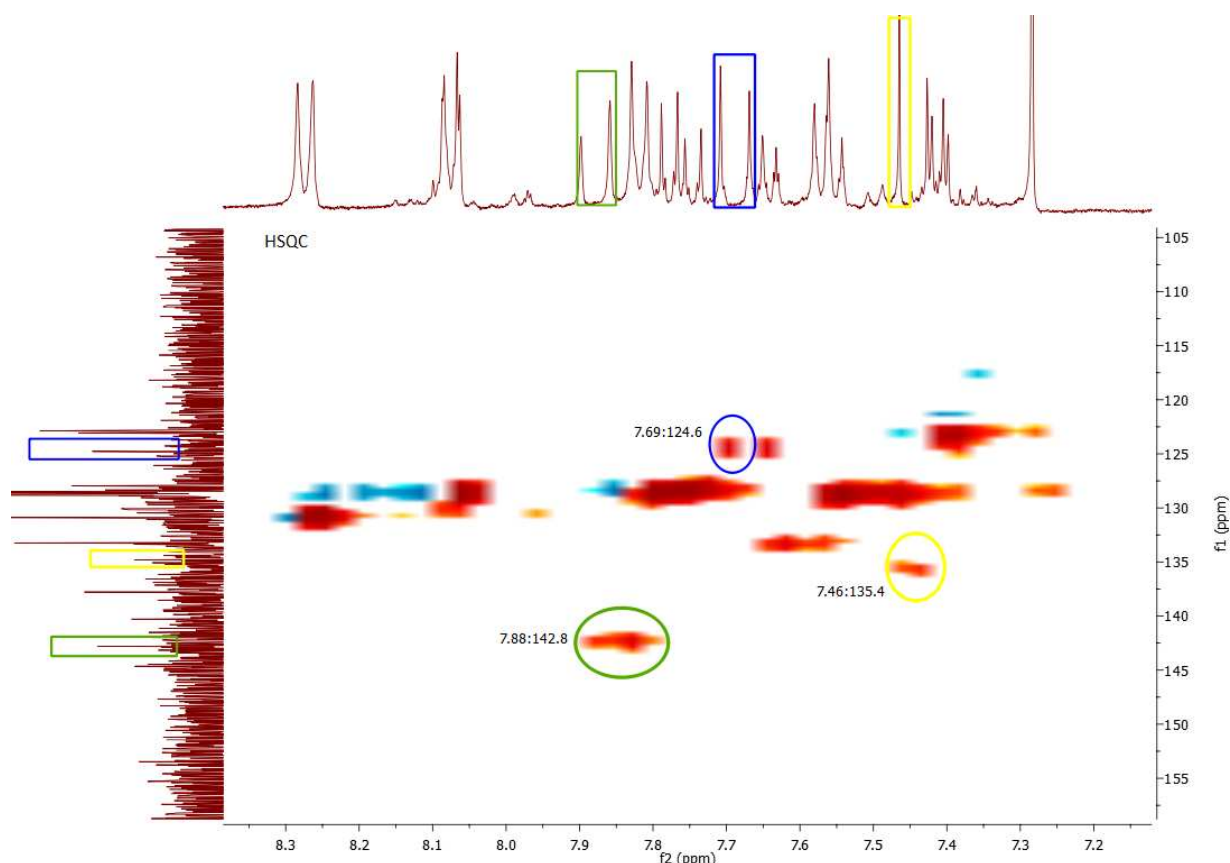


Figura 3.26– Experimento de HSQC de **MMC01113**. Los círculos indican la correlación heteronuclear $^1\text{H}:$ ^{13}C a un enlace de distancia.

El método de correlación presentado anteriormente depende de la presencia de al menos un protón unido a un heteroátomo (^{13}C en este caso) y no es capaz de identificar carbonos que no posean protones. Un método alternativo en dichos casos consiste en establecer correlaciones entre carbonos y protones vecinos a más de un enlace, llamadas correlaciones a larga distancia o a varios enlaces, y es conocido comúnmente como HMBC. En la *figura 3.27* se presenta el espectro de HMBC para el híbrido **MMC01113**.

A modo de ejemplo se van a discutir algunos patrones de correlación a 2 y 3 enlaces de distancia. En color azul se representan los protones aromáticos $\text{Hd}:\text{Hd}'$ correlacionados con el carbono carbonílico del grupo éster (163.8 ppm) a 3 enlaces de distancia. En color gris se representan las correlaciones con el carbono cuaternario del anillo aromático A de la chalcona ($\text{C}_{\text{Ar}}-(\text{C}=\text{O})-\text{C}_{\text{Hg}}=\text{C}_{\text{Hf}}$). Los tres círculos grises corresponden a la correlación de los protones $\text{Hi}:\text{Hi}'$ y Hg a 3 enlaces de distancia y $\text{Hh}:\text{Hh}'$ a 2 enlaces de distancia. En color verde se representa la correlación $^1\text{H}:$ ^{13}C a 3 enlaces de distancia correspondiente a los protones aromáticos $\text{Hb}:\text{Hb}'$ el carbono cuaternario del heterociclo ($\text{C}_{\text{Het}}=\text{C}-\text{Ha}$).

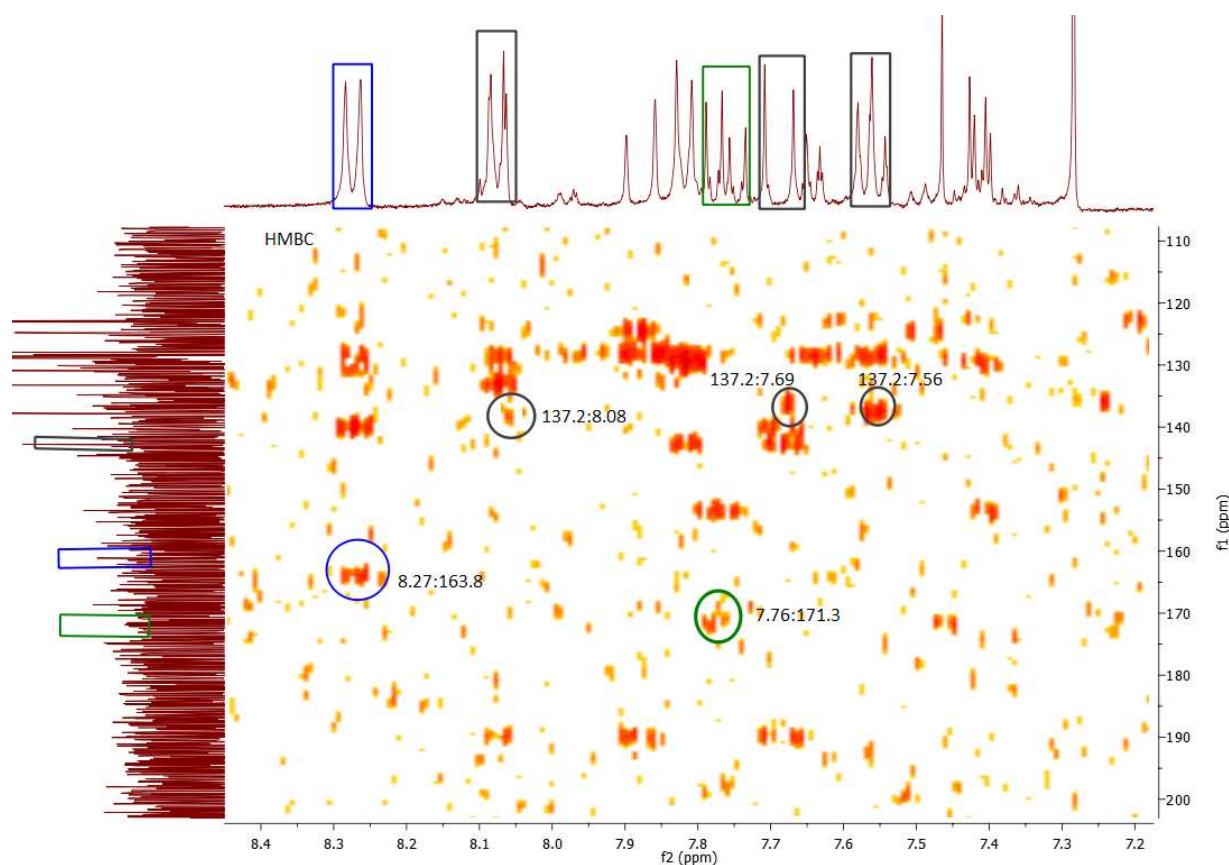


Figura 3.27– Experimento de HMBC de **MMC01113**. Los círculos indican las correlaciones heteronucleares ^1H : ^{13}C a dos o tres enlaces de distancia.

Como se puede observar en la *figura 3.27*, la intensidad de los carbonos seleccionados para la discusión es baja. Esto se debe a que estos carbonos (cuaternarios todos ellos) presentan un tiempo de relajación elevado que es mayor al tiempo que transcurre entre pulso y pulso lo que hace que la intensidad de estos carbonos sea menor que la del resto (generalmente a mayor sustitución mayor tiempo de relajación y generalmente menor intensidad de señal).

3.2 Evaluación biológica

3.2.1 Generalidades

Modelo celular

Con la finalidad de determinar la capacidad inductora de los compuestos desarrollados sobre las enzimas detoxificantes y de predecir los mecanismos moleculares involucrados, se llevaron a cabo ensayos *in vitro* sobre dos líneas celulares, que permiten evaluar la selectividad en la inducción enzimática por parte de estos compuestos. La cepa salvaje (*wt*) Hepa1c1c7 proveniente de hepatoma de ratón presenta morfología de tipo epitelial y son células altamente inducibles para citocromos P450, por lo que resultan útiles para estudiar la vía AhR-XRE. La otra cepa es una variante de la *wt* denominada BprC1 que se diferencia de la primera por presentar truncada la proteína translocadora AhR⁶².

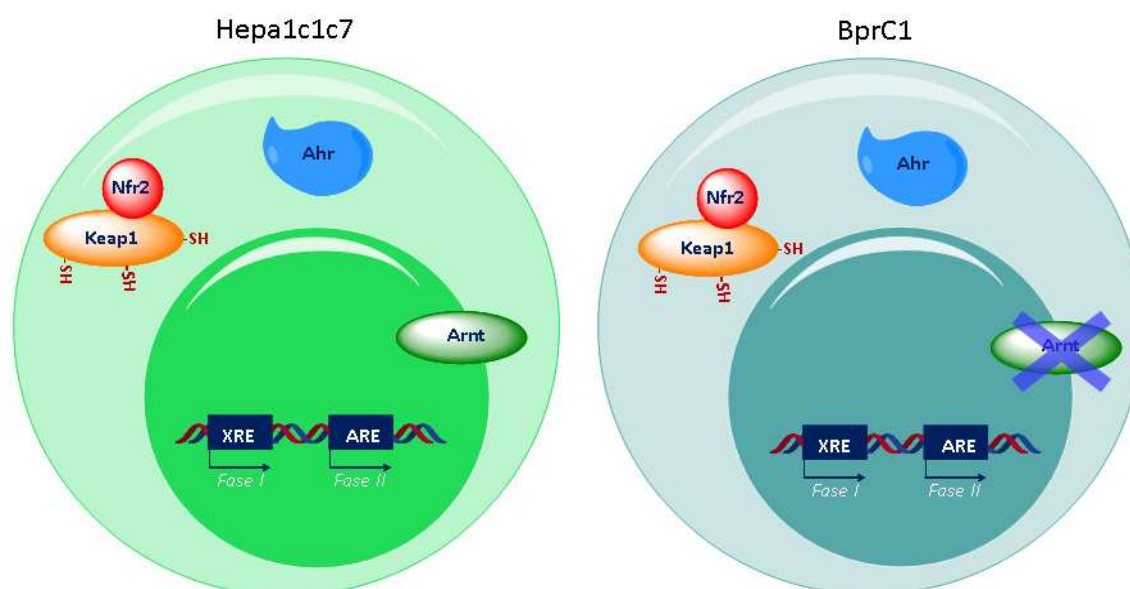


Figura 3.28 – Esquemas de las líneas celulares empleadas, la cepa salvaje Hepa1c1c7 y la mutante de ésta, BprC1.

A modo representativo se presenta en la *figura 3.28* 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) y por tanto la vía AhR-XRE se encuentra inactiva. De esta manera se puede comparar la actividad enzimática obtenida en ambas cepas y estimar los mecanismos involucrados en la activación de genes codificantes de enzimas metabolizadoras de xenobióticos.

3.2.2 Medida de la inducción de QR y GST para los compuestos de las series I y II

Los resultados obtenidos en la evaluación de los compuestos pertenecientes a las series I y II frente a la inducción de QR y de GST se presentan en la *tabla 3.11* y en la *figura 3.29*. Todos los compuestos fueron evaluados inicialmente a dosis fija de 10 μ M. Los resultados se expresan como tasa de inducción de QR o GST, es decir (actividad QR o GST células tratadas/ (actividad QR o GST células sin tratamiento). De esta manera, cuando se obtienen valores superiores a 1, puede afirmarse que el compuesto en cuestión es inductor de QR o GST en esas condiciones. El comportamiento de los diferentes compuestos frente a la inducción de algunas de las enzimas puede dividirse en tres clases: 1) **inductores de tipo bifuncional**; son aquellos que inducen a la enzima sólo en la línea celular Hepa1c1c7 o cuya inducción en Hepa1c1c7 es significativamente mayor que en BprC1; 2) **inductores monofuncionales**, que inducen la enzima en ambas cepas y casi con la misma potencia; 3) **inductores excepcionales** de los cuales, *a priori*, no se conoce el mecanismo involucrado por el cual inducen a la enzima con mayor potencia en la cepa mutante (BprC1) que en Hepa1c1c7. Esta clasificación se puede apreciar más claramente en la *tabla 3.10*.

Tabla 3.10 - Clasificación de inductores de enzimas detoxificantes de fase II según ensayo a dosis fija de inducción de QR y GST.

Clasificación		Activos en Hepa1c1c7	Activos en BprC1	Observaciones
I				Inactivos
II		√	√	Inductores monofuncionales
III	A	√		Inductores bifuncionales*
	B		√	Inductores excepcionales*

* Aquellos inductores con carácter bifuncional o excepcional pero que provocan un incremento $\geq$ al 30% en ambas líneas celulares respecto al control negativo serán considerados inductores monofuncionales siempre y cuando la actividad en una línea no triplique la de la otra.

Observando los resultados obtenidos se puede inferirse que ocho de los nueve compuestos evaluados resultaron activos en QR en diferente medida, mientras que en GST, la totalidad de los derivados mostraron actividad.

Es interesante comparar la actividad lograda por los compuestos híbridos ditiolitiona-chalcona vs los fragmentos aislados que componen los correspondientes híbridos.

En este sentido podemos observar (*tabla 3.11*) que la chalcona de partida **MMC01110** presenta inducción moderada de QR en ambas líneas celulares con comportamiento inductor excepcional. No obstante el correspondiente híbrido, **MMC01113**, resulta un claro inductor monofuncional, alcanzando además a duplicar la actividad lograda en Hepa1c1c7 por la chalcona de partida (1,40 vs 1,20). Analizando el otro fragmento del híbrido de manera aislada, es decir **MMC01102**, se puede apreciar que alcanza una potente inducción de QR en ambas líneas celulares, pero el carácter de esta inducción es claramente bifuncional. Ahora bien, cuando pasa a formar parte del correspondiente híbrido dicho carácter bifuncional se revierte y adopta un comportamiento notoriamente monofuncional. Comparando con la inducción producida para GST, puede observarse que la tasa de actividad de la chalcona **MMC0110** se presenta levemente potenciada en ambas líneas celulares cuando está formando el

híbrido. A su vez el comportamiento del fragmento ditioltionona es análogo a lo descrito para QR. Cuando éste se encuentra aislado su carácter es claramente bifuncional, mientras que cuando está formando parte del híbrido adopta carácter monofuncional.

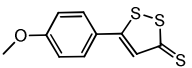
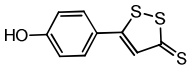
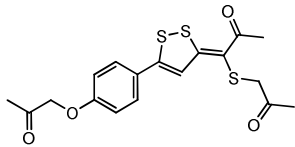
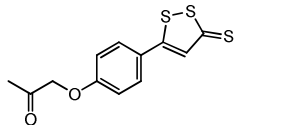
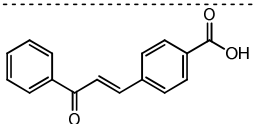
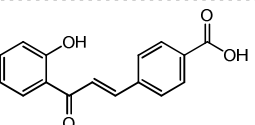
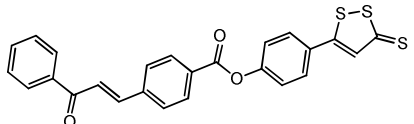
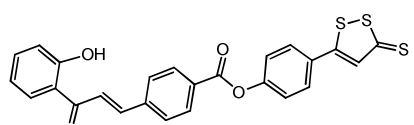
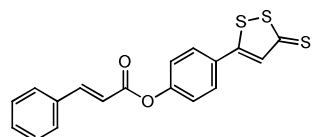
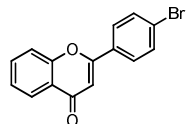
Compuesto	Estructura	Tasa de actividad de QR		Tasa de actividad de GST	
		Hepa1c1c7	BprC1	Hepa1c1c7	BprC1
MMC01101		1,17 ± 0,01	1,79 ± 0,01	1,38 ± 0,09	1,28 ± 0,04
MMC01102		3,43 ± 0,07	1,67 ± 0,01	1,65 ± 0,11	0,76 ± 0,03
MMC01103		2,01 ± 0,02	1,75 ± 0,04	1,51 ± 0,10	1,59 ± 0,11
MMC01109		1,00 ± 0,01	0,93 ± 0,01	1,60 ± 0,10	1,53 ± 0,09
MMC01110		1,20 ± 0,01	1,70 ± 0,02	1,19 ± 0,08	1,47 ± 0,05
MMC01116		1,61 ± 0,01	1,21 ± 0,02	1,35 ± 0,02	1,31 ± 0,01
MMC01113		1,41 ± 0,02	1,60 ± 0,01	1,22 ± 0,08	1,52 ± 0,08
MMC01119		2,22 ± 0,02	1,34 ± 0,01	2,35 ± 0,48	1,43 ± 0,01
MMC01126		1,87 ± 0,01	1,74 ± 0,02	2,21 ± 0,08	2,15 ± 0,08
Fv4Br		5,40 ± 0,02	2,20 ± 0,01	4,21 ± 0,03	1,54 ± 0,03

Tabla 3.11 – Resultados de inducción de QR y de GST por los precursores tipo chalcona y ditioltionona y por los compuestos híbridos de las series I y II. Los resultados se expresan como tasa de actividad (células tratadas/ células control negativo) ± DE. Se incluye el resultado del inductor bifuncional 4'-Bromoflavona (Fv4Br) como control positivo del ensayo.

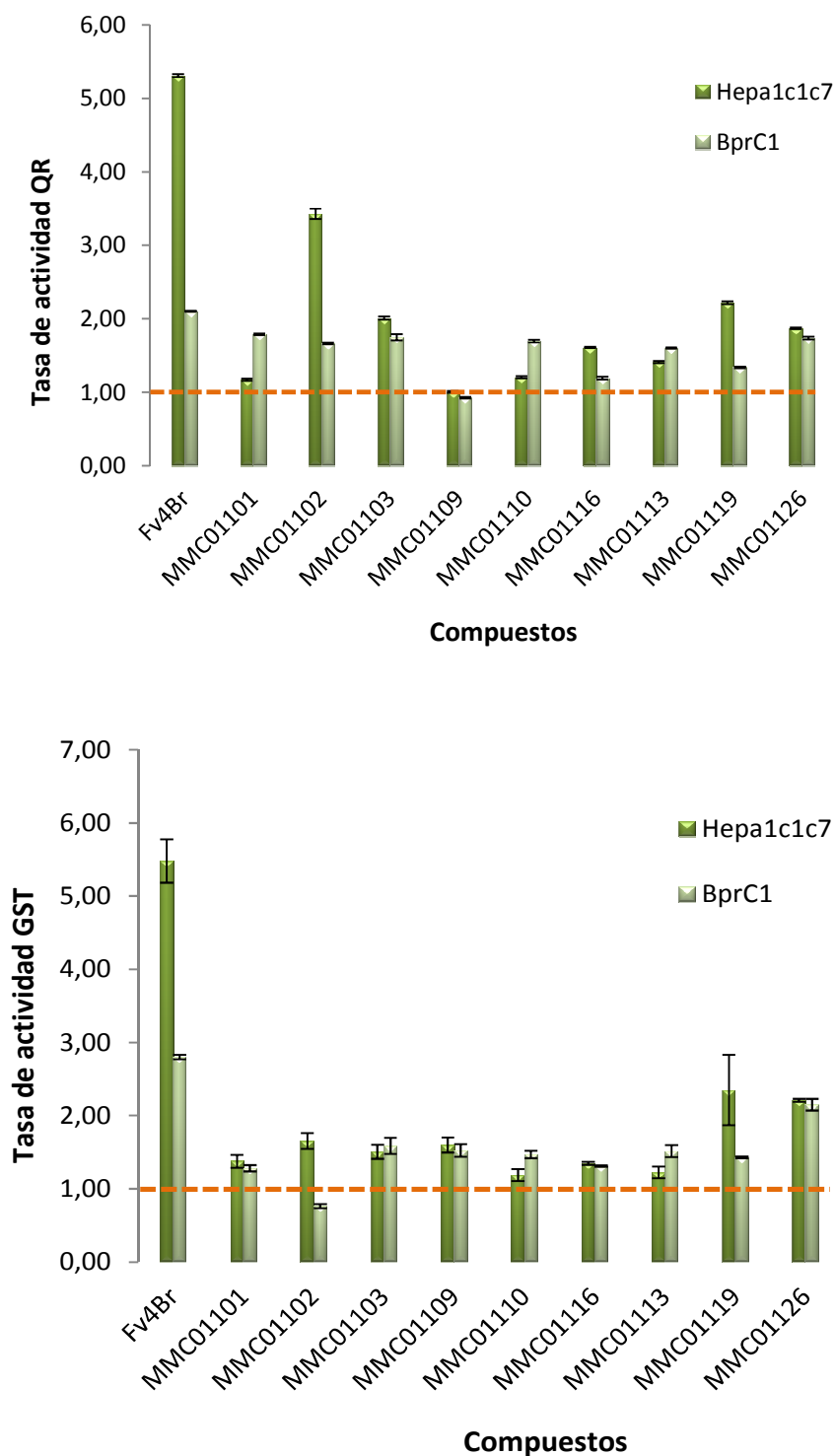


Figura 3.29 – Representación gráfica de los datos mostrados en la *tabla 3.11*. La línea punteada indica el punto de corte para considerar un compuesto con la actividad de interés.

Haciendo el mismo estudio para la o-hidroxichalcona **MMC01116** y su correspondiente híbrido **MMC01119** puede observarse que ambos resultaron ser inductores bifuncionales de QR sin embargo el compuesto híbrido resultó ser un inductor mucho más potente en ambas líneas celulares, alcanzando tasas de actividad de 2,22 de QR y 2,35 de GST en Hepa1c1c7. Observando el comportamiento del fragmento ditioltionas sobre la expresión de QR puede observarse que, si bien no se revierte el carácter bifuncional que presenta **MMC01102**, cuando éste forma parte de híbrido, es notorio que el carácter bifuncional ya no es tan marcado, es decir que la diferencia de inducción en ambas cepas ya no es tan grande. En GST no se puede observar este comportamiento, pero lo que se puede inferir es que existe un aumento en la potencia de inducción de ambas líneas celulares.

Continuando con el análisis puede observarse que el derivado **MMC01126**, generado de la reacción de esterificación entre el ácido cinámico y el derivado **MMC01102**, fue uno de los híbridos que presentó mejor comportamiento biológico. Su comportamiento como inductor, tanto para QR como para GST, fue claramente monofuncional, presentando además una de las mejores tasas de inducción entre los compuestos evaluados en este trabajo. Otro aspecto que cabe destacar es que si bien no se evaluó el fragmento correspondiente al ácido cinámico está descrito en la literatura que éste no presenta inducción de dichas enzimas⁶³. Este resultado resalta la importancia de generar estructuras híbridas a partir de dos posibles farmacóforos donde la actividad biológica lograda es consecuencia de un efecto sinérgico de la hibridación molecular.

Otro aspecto novedoso de este trabajo surge de la actividad exhibida por el derivado **MMC01103**, dado que en la actualidad no se encuentran datos bibliográficos para derivados disustituidos del heterociclo 3H-1,2-ditio1 como agrupamiento farmacofórico capaz de inducir enzimas de fase II.

El compuesto **MMC01103** resultó ser inductor de QR y GST con carácter monofuncional y potencia de inducción mayor al 50 % en ambas líneas celulares a la dosis de ensayo. Si bien éste no presenta el agrupamiento típico 1,2-ditio1-3-tionas, es un compuesto químicamente relacionado puesto que conserva el fragmento 1,2-ditio1 en su estructura.

En la literatura está descrito que ciertos compuestos azufrados, químicamente no relacionados con las ditioltionas, tienen la capacidad de inducir genes de fase II⁶⁴(figura 3.30). Una de las teorías más aceptadas que podría explicar la inducción de dichas enzimas por parte de estos compuestos y de las ditioltionas, sería mediante la activación de la vía Nrf2-ARE mediada por la liberación de sulfuro de hidrógeno⁶⁵. Recientemente se ha correlacionado la capacidad de liberación de sulfuro de hidrógeno por parte de varios compuestos azufrados (figura 3.30) con la habilidad de inducir la expresión de enzimas de fase II de forma monofuncional. Esta sería una de las hipótesis que lograría explicar el comportamiento del derivado **MMC01103** frente a la inducción de QR, si bien se necesitarían estudios *in vitro* e *in vivo* de cuantificación de sulfuro de hidrógeno para afirmar tal suposición. Otra causa que podría explicar dicha inducción por parte de este derivado, sería la presencia del centro aceptor de Michael exocíclico sustituido en la posición 3 por un agrupamiento S-metilcetona, que como ya se mencionó, este tipo de motivo estructural poseen la capacidad de inducir genes de enzimas de fase II.

Por otra parte, comparando los derivados **MMC01101** y **MMC01102** puede observarse que existe en la línea celular Hepa1c1c7, tanto para QR como para GST, una notoria diferencia de inducción a favor del derivado **MMC01102**. Esto concuerda con estudios cuantitativos de relación estructura-actividad (QSAR)

llevado a cabo por Burgot y colaboradores⁶⁶. Los mismos evaluaron una serie de 16 ditioltionas y encontraron que para todos los casos, las ditioltionas menos lipófilas eran las más activas.

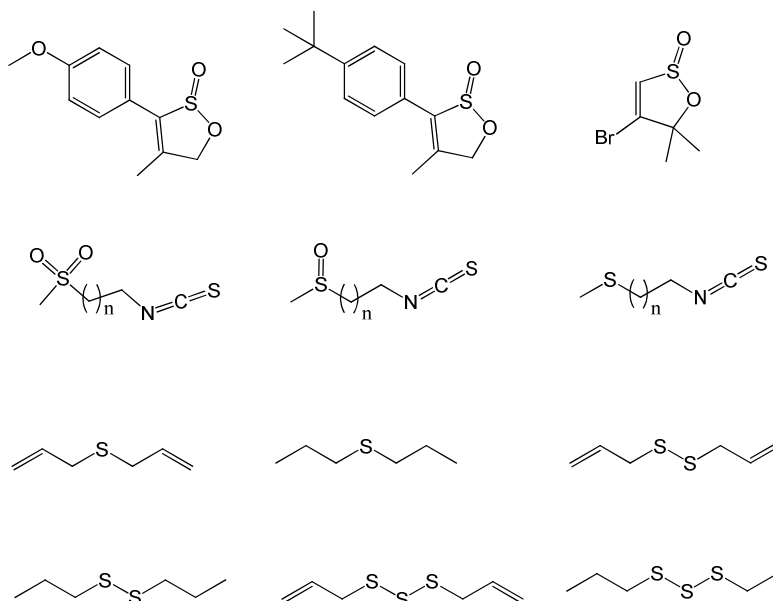


Figura 3.30 – Compuestos azufrados descritos en la literatura como inductores de enzimas de fase II.

3.2.3 Determinación de los parámetros CD, IC₅₀ e IQ

En base a los resultados obtenidos en el ensayo primario a dosis fija de actividad de QR y GST se seleccionaron los compuestos **MMC01103**, **MMC01113** y **MMC01126** para evaluar la capacidad de los mismos de inducir QR a distintas concentraciones en ambas cepas de hepatoma de ratón y con los resultados obtenidos de tasa de actividad de QR se construyeron curvas de dosis respuesta de los compuestos.

Cabe destacar que el híbrido **MMC01119** no fue tomado en cuenta para este tipo de estudio puesto que en el ensayo a dosis fija (10 μ M) el mismo resultó ser un inductor tipo bifuncional y como ya se mencionó anteriormente, esto no es lo deseado para los compuestos desarrollados.

Por otro lado se determinó el porcentaje de supervivencia celular a distintas concentraciones del producto y se construyeron curvas de citotoxicidad, en donde se visualiza la variación de la supervivencia celular con la concentración.

A modo de ejemplo se presenta en la *figura 3.31* los resultados obtenidos para el híbrido **MMC01126**.

Como ya se mencionó el derivado **MMC01126** (*ver tabla 3.11*) resultó ser potencialmente activo en ambas líneas en el ensayo de tamizaje a dosis fija (10 μ M), por lo que resulta interesante evaluar su capacidad de inducción a distintas concentraciones. Como era de esperarse, dicho híbrido fue levemente más activo en Hepa1c1c7 que en BprC1 en la mayoría de las concentraciones evaluadas. La curva de dosis respuesta en Hepa1c1c7 tiene una tendencia creciente para todas las concentraciones evaluadas mientras que en BprC1 se puede observar que a 20 μ M no persiste el incremento de actividad si no que permanece en estado cuasi estacionario (*figura 3.31*). Este comportamiento podría explicarse probablemente por alguna de las siguientes causas: o bien por fenómenos asociados a cinéticas de

captación del compuesto (diferencial para cada línea celular), o bien por fenómenos asociados a la solubilidad/agregación del compuesto. Analizando la *figura 2.31* se puede observar que en ambas líneas celulares existe un punto de inflexión cercano a 10 μM lo que también podría ser un indicativo de que en el entorno de esta dosis existe un efecto probablemente vinculado a los fenómenos anteriormente mencionados.

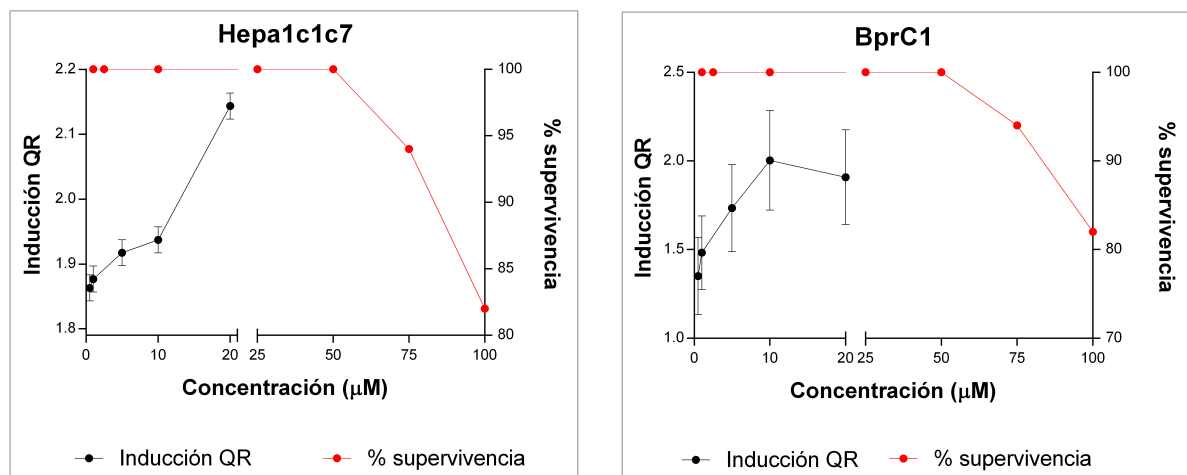


Figura 3.31 – Curvas dosis-inducción de la enzima (en negro) y de dosis-citotoxicidad (en rojo) obtenidas para el híbrido **MMC01126**.

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% del crecimiento celular (IC_{50}). A partir de los resultados de CD e IC_{50} es posible determinar el índice de quimioprevención (IQ, *tabla 3.13*). Éste, que se calcula como IC_{50}/CD , se determina para estimar que tan bueno es un compuesto como potencial agente quimiopreventivo contra el cáncer, de modo que cuanto mayor sea este valor, mayor capacidad quimiopreventiva presenta el compuesto en cuestión⁶⁷.

Lo deseable sería que el valor de IC_{50} sea elevado (baja toxicidad frente a las líneas ensayadas) y que el CD sea bajo, es decir que se logre duplicar la actividad enzimática de QR a bajas concentraciones. Comparando los índices de quimioprevención obtenidos para un mismo compuesto en ambas líneas, 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 línea que posee la vía AhR-XRE truncada, por la cual no es deseable que se induzca actividad de enzimas detoxificantes de fase II. Analizando los datos de la *tabla 3.13*, respecto a los derivados **MMC01103** y **MMC0113** se puede destacar que si bien sus comportamientos no fueron los esperados surgen aspectos interesantes para la discusión. En primer lugar cabe resaltar la baja citotoxicidad exhibida por **MMC01113** en ambas líneas celulares (IC_{50} mayor a 100 μM). Este resultado sigue la tendencia general mostrada por análogos de las chalconas de partida y es una característica deseable que permanezca en la entidad híbrida^{68,69}. En este sentido **MMC01103** mostró ser el compuesto más citotóxico dentro de los aquí evaluados y el único que no presenta un fragmento tipo chalcona al no ser una estructura híbrida. Para extraer conclusiones significativas de este comportamiento habría que hibridizar **MMC01103** con chalconas previamente descritas como no citotóxicas. Considerando el comportamiento de **MMC01103** y **MMC0113** en el ensayo a dosis fija (ver *tabla 3.11*, pag. 55) se concluye que ambos compuestos resultan ser inductores

monofuncionales. Sin embargo analizando más en detalle los valores obtenidos, puede observarse que **MMC01103** es levemente más potente en Hepa1c1c7 mientras que **MMC01113** lo es en BprC1. Retomando el estudio dosis-respuesta (*tabla 3.13*) esta tendencia se corrobora. Fue posible hallar para las concentraciones evaluadas el CD de **MMC01103** en Hepa1c1c7 y de **MMC01113** en BprC1; no obstante, a la máxima dosis ensayada (20 μ M) no se consiguió alcanzar tasas de actividad de QR que dupliquen el control negativo de **MMC01103** en BprC1 y de **MMC01113** en Hepa1c1c7. Desde otro punto de vista, si se comparan los parámetros CD, IC₅₀ e IQ para **MMC01103** y **MMC01113**, es claro que el segundo muestra un mejor perfil como agente quimiopreventivo para el cáncer dada su baja citotoxicidad y valor de CD en la BprC1 consiguiendo valores de IQ mayores a cinco en esta línea celular.

Tabla 3.13 – Valores de CD, IC₅₀ e IQ obtenidos para los compuestos **MMC01103**, **MMC01113** y **MMC01126**.

Compuesto	Hepa1c1c7			BprC1		
	CD (μ M)	IC ₅₀ (μ M)	IQ	CD (μ M)	IC ₅₀ (μ M)	IQ
MMC01103	12,3	26,0	2,1	> 20,0	51,0	< 2,6
MMC01113	> 20,0	> 100,0	~ 5,0	19,1	> 100,0	> 5,2
MMC01126	11,3	> 100,0	>8,8	10,0	> 100,0	> 10,0
Fv4Br	0,8	85,0	107,0	> 75,0	150,0	< 2,0
t-BHQ	1,0	147,0	147,0	6,0	60,0	10,0
ADT*	30**	-	-	-	-	-

* En este trabajo nombrado como **MMC01101**, **tomado de ⁷⁰

Como se puede observar en la *tabla 3.13*, el compuesto más relevante dentro de los evaluados fue **MMC01126** dado que posee valores de CD del orden de los 10 μ M en ambas líneas celulares, afirmando su carácter de inducción claramente monofuncional. Comparando los valores de CD de dicho híbrido con el inductor *t*-BHQ se puede observar que los mismos difieren levemente. Sin embargo, la *t*-BHQ presenta mayor citotoxicidad en BprC1 que el híbrido en cuestión. Así, **MMC01126** presenta mayor índice de quimioprevención (IQ > 10) en la línea BprC1 que el compuesto antes mencionado y descrito en la literatura como agente quimiopreventivo potente inductor⁷¹. Cabe resaltar también que si bien el valor CD en Hepa1c1c7 es aproximadamente diez veces mayor al valor de CD del control positivo bifuncional (Fv4Br), en BprC1 fue significativamente menor. Por lo tanto entonces el compuesto **MMC01126** presenta un valor de IQ cinco veces superior en la línea BprC1 que dicho control positivo. Este resultado es relevante, ya que si bien el flavonoide Fv4Br es un inductor bifuncional, es bien conocido su poder quimiopreventivo para el cáncer actuando a través de la modulación de enzimas de fase II⁷². Finalizando con la discusión para el derivado más interesante cabe compararlo con la ditioltionina ADT (aquí llamada **MMC01101**) que de acuerdo a los datos bibliográficos posee un CD_{Hepa1c1c7} de 30 μ M y por tanto tres veces mayor al obtenido por el derivado **MMC01126**. Este hecho resalta nuevamente el efecto positivo logrado gracias a la hibridación molecular.

4. Conclusiones y perspectivas

4.1 Conclusiones y perspectivas

Durante la realización de este trabajo fueron diseñadas, sintetizadas y caracterizadas dos series de compuestos. Por un lado, se logró la síntesis de derivados de compuestos tipo chalconas, los cuales fueron obtenidos con excelentes rendimientos utilizando procedimientos de síntesis sencillos, de bajo costo y de alta eficiencia atómica. Por otra parte, se logró sintetizar derivados del heterociclo 3*H*-1,2-ditio1-3-iona con buenos rendimientos aplicando metodologías sintéticas convencionales y modernas como es la síntesis asistida a través irradiación de microondas. Este procedimiento condujo a rendimientos de reacciones mayores o similares a aquellos de las condiciones de calentamiento convencional y con una notoria disminución de los tiempos de los procesos sintéticos. Por último, una vez generados los materiales de partida se procedió a generar la primera y segunda serie de compuestos (compuestos híbridos), los cuales fueron obtenidos con rendimientos de moderados a buenos.

Se obtuvo de manera accidental, utilizando metodología sintética convencional y moderna, un derivado del heterociclo 1,2-ditio1 que presentó en el ensayo primario a dosis fija, tanto para QR como para GST, una inducción con carácter monofuncional y además una potencia de inducción mayor al 50 % en ambas líneas celulares siendo un potencial agente quimiopreventivo para el cáncer.

A través del ensayo *in vitro* se logró identificar que los tres compuestos híbridos diseñados presentaron, en mayor o menor medida, inducción tanto de QR como de GST en ambas líneas celulares. Dos de los derivados presentaron el comportamiento deseado, es decir inducción de enzimas de fase II con carácter monofuncional, mientras que el tercer derivado presentó carácter de inducción bifuncional.

Se identificó el híbrido **MMC01126** como un muy buen agente quimiopreventivo aun mejorando el perfil de la t-Butilhidroquinona y 4-bromoflavona reconocidos agentes quimiopreventivos.

Como perspectiva, sería relevante confirmar que la activación de las enzimas QR y GST se da efectivamente por la vía Nrf2-ARE. Esta confirmación se podría realizar mediante estudios de inmunocitoquímica, marcando el Nrf2 y visualizando su translocación al núcleo.

Además, sería interesante correlacionar la inducción selectiva de enzimas de fase II por la vía Nrf2-ARE y la capacidad quimiopreventiva a través de un modelo de carcinogénesis inducida químicamente *in vivo*.

Por último, sería interesante diseñar y sintetizar nuevas entidades híbridas ditioltiona-chalcona y evaluar su capacidad de modulación de enzimas de fase II.

5. Materiales y métodos

5.1 Química

5.1.1 Materiales

En este apartado se detallan los procedimientos experimentales y el análisis espectroscópico de los productos finales e intermedios obtenidos.

Los disolventes se purifican y secan previo a su uso, por métodos convencionales⁷³. Todos los reactivos provienen de fuentes comerciales (Sigma-Aldrich, Janssen, Merck, Fluka, entre otros) y se utilizan sin purificar, excepto que se indique de otra forma.

Los grados de avance de las reacciones y la pureza de los productos se examinan mediante cromatografía en capa fina (CCF). Se utiliza sílicagel con indicador fluorescente sobre placas de poliéster (Alugram® Sil G/UV254) u óxido de aluminio con indicador fluorescente sobre placas de poliéster (Poligram® Alox N/UV254). Las fases móviles utilizadas han sido mezclas en distintas proporciones de AE, EP, Et₂O:EP, CH₂Cl₂:MeOH y CH₂Cl₂:EP. Los cromatogramas se revelan por alguno de los siguientes métodos:

- Exposición a luz UV (254 nm).
- Exposición a vapores de I₂.
- Asperjado con una mezcla de EtOH:H₂SO₄:anisaldehído (95:4:1) y posterior quemado.
- Asperjado con reactivo de Brady.

Para las CC, se utiliza sílicagel (Merck, 60–230 mesh) o alúmina (Merck, 70-230 mesh) como soporte sólido y disolventes adecuados como fase móvil.

Los puntos de fusión se determinan en un equipo Electrothermal 9100.

Los experimentos con irradiación de microondas fueron realizados en un sistema multimodo WX-4000 de EU Chemical Instrument Co, con un rango de potencia de 100 – 1000 W. Se utilizaron reactores de Teflón sellados con una capacidad de 60 mL y 20 mL. La temperatura fue monitoreada mediante una fibra óptica protegida con una cubierta de teflón, insertada directamente en el medio de reacción. Las mezclas de reacción fueron agitadas con un sistema magnético de rotación ubicado debajo de la cavidad del microondas. La temperatura y presión fueron monitorizadas con el software comercial brindado por el fabricante.

Los espectros de ¹H-RMN y ¹³C-RMN se realizan en un equipo BRUKER DPX-400 (400 MHz), empleando los disolventes especificados en cada caso y TMS como referencia interna.

Los valores de desplazamiento químico son descritos en unidades de δ (ppm) y las constantes de acoplamiento (J) vienen dadas en hercios (Hz). En el caso de los espectros de ¹³C-RMN realizados en CDCl₃ el pico central del triplete de CDCl₃ se asigna como 77,0 ppm. Las asignaciones de H y C se realizan en base a experimentos de 2D-RMN (¹H-¹H-COSY, ¹H-¹³C-HSQC y ¹H-¹³C-HMBC). Para los experimentos de HMBC y HSQC se utilizaron las secuencias de pulsos disponibles en el software del equipo. Las multiplicidades se designan como: singulete (s), doblete (d), triplete (t), multiplete (m), doble doblete (dd) y doble triplete (dt), señal ancha (sa).

La espectrometría de masas fue realizada utilizando equipos LC/MSD-Serie 100 Hewlett–Packard con el método de Ionización por Electrospray (IES-EM), equipo Shimadzu QP-2010 mediante impacto electrónico (IE-EM).

5.1.2 Métodos

5.1.2.1 Síntesis de los reactivos para la preparación de los agentes híbridos

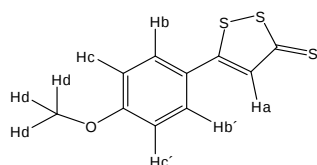
Síntesis de 5-(4-metoxifenil)-3*H*-1,2-ditio-3-tiona, (ADT, MMC01101)

Calentamiento convencional (adaptado de ⁵⁹).

En un balón de 100 mL se hacen reaccionar, bajo agitación vigorosa y en un ambiente anhidro, para lo cual se emplea una campana de CaCl₂, 80 mmol (11,84 g) de anetol y 560 mmol de azufre (17,92 g) en 40 mL de *N,N*-dimetilacetamida. La mezcla de reacción se calienta a 145 °C durante 6 horas. El seguimiento de la reacción se realiza por CCF en alúmina con una mezcla de EP:AE (80:20) como fase móvil. Transcurrido este tiempo, se detiene el calentamiento y se deja la reacción toda la noche a T.A con el objetivo de que precipite el azufre que no reaccionó; el mismo se elimina mediante filtración a vacío. La disolución se vuelca cuidadosamente sobre una mezcla de agua-hielo (400 mL) con el fin de que precipite el ADT. El sólido amorfo obtenido se lava con éter para remover trazas de anetol adsorbido que no reaccionó. El producto obtenido se purifica mediante cristalización en AE. Los cristales obtenidos se filtran a vacío y se dejan en un desecador.

Calentamiento asistido por MO

Una mezcla de anetol (1,184 g, 8 mmol), azufre (1,79 g, 56 mmol) y *N,N*-dimetilacetamida (4 mL) es colocada en un reactor de teflón cerrado herméticamente. La misma se homogeniza y se la irradia con energía de microondas durante 12 minutos con una potencia de 300 W, alcanzando una temperatura máxima de 119 °C. El seguimiento de la reacción se realiza por CCF en alúmina con una mezcla de EP:AE (70:30) como fase móvil. Se deja enfriar la mezcla a T.A durante toda la noche. Luego se filtra a vacío el azufre que no reaccionó. El disolvente se evapora a presión reducida y el residuo se disuelve en AE y se extrae 3 x 30 mL con disolución saturada de NaCl. Las capas orgánicas combinadas se secan con Na₂SO₄ anhidro y el disolvente es evaporado a presión reducida. El producto se purifica mediante CC en sílica.



Fórmula empírica: C₁₀H₈OS₃

Punto de fusión (°C): 109-110 °C

Aspecto: cristal rojo

Rendimiento: calentamiento convencional: 17%; MO: 11%

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ_H (ppm): 7,64 (d, *J* = 8,8 Hz, 2H, **Hb:Hb'**), 7,42 (s, 1H, **Ha**), 7,00 (d, *J* = 8,8 Hz, 2H, **Hc:Hc'**), 3,90 (s, 3H, **Hd**). ¹³C-NMR δ_C (ppm) (a partir de experimentos de HSQC y HMBC): 55,6 (**C-Hd**), 115,0 (**C-Hc:Hc'**), 124,1 (**C_{Ar}-C-S-S**), 128,6 (**C-Hb:Hb'**), 134,6 (**C-Ha**), 162,9 (**C_{Ar}-OCH₃**), 173,1 (**C_{Het}=C-Ha**), 215,1 (**C=S**).

MS: TOF MS ES+ *m/z* (%): **ADT** (M+Na)⁺ = 263,0727 **Dímero** (M+Na)⁺ = 504,9349/502,9375.

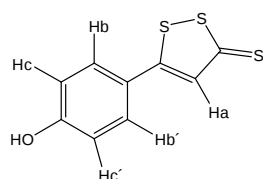
Síntesis de 5-(4-hidroxifenil)-3*H*-1,2-ditio-3-tiona, (5-OH-ADT, MMC01102)

Calentamiento convencional (Adaptado de⁵⁹).

En un balón de 25 mL se hacen reaccionar, bajo agitación vigorosa ADT (0,211 g, 0,88 mmol) y clorhidrato de piridinio (1,052 g, 9 mmol). La mezcla de reacción se calienta durante 25 minutos a 215 °C. El seguimiento de la reacción se realiza por CC F en sílica con una mezcla de EP:AE (60:40) como fase móvil. Una vez enfriada la solución a T.A, se procede a realizar las extracciones en AE:HCl (3 x 30 mL). Las capas orgánicas combinadas se lavan con agua hasta neutralidad (3 x 30 mL) y se secan con Na₂SO₄ anhidro, el disolvente es evaporado a presión reducida. El producto se purifica mediante CC en sílica.

Calentamiento asistido por MO

Una mezcla de ADT (0,2 g, 0,8 mmol) y clorhidrato de piridinio (1 g, 8 mmol) es colocada en un reactor de teflón cerrado herméticamente y calentada a 200 °C durante 5 min (potencia máxima = 300 W, presión máxima = 4 atm). El seguimiento de la reacción se realiza por CCF en sílica con una mezcla de EP:AE (60:40) como fase móvil. Una vez enfriada la solución a T.A, se procede a realizar las extracciones en CH₂Cl₂:HCl (3 x 30 mL). Las capas orgánicas combinadas se lavan con agua hasta neutralidad (3 x 30 mL) y se secan con Na₂SO₄ anhidro, el disolvente es evaporado a presión reducida. El producto se purifica mediante CC en sílica.



Fórmula empírica: C₉H₆OS₃

Punto de fusión (°C): 191-193 °C

Aspecto: sólido naranja

Rendimiento: calentamiento convencional: 25%; MO: 50-70%

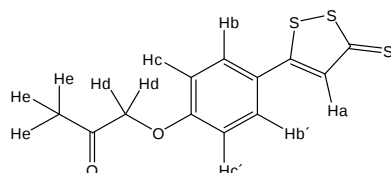
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ_H (ppm): 7,61 (d, *J* = 8,8 Hz, 2H, **Hb:Hb'**), 7,41 (s, 1H, **Ha**), 6,95 (d, *J* = 8,8 Hz, 2H, **Hc:Hc'**), 6,78 (s, 1H, **OH**). ¹³C-NMR δ_C (ppm) (a partir de experimentos de HSQC y HMBC): 116,6 (**C-Hc:Hc'**), 124,0 (**C_{Ar}-C-S-S**), 128,3 (**C-Hb:Hb'**), 134,6 (**C-Ha**), 164,5 (**C_{Ar}-OH**), 173,3 (**C_{Het}=C-Ha**), 214,5 (**C=S**).

MS: TOF MS ES+ *m/z* (%): **5-OH-ADT** (*M*⁺ - 1) = 224,9500.

Síntesis de 5-(4-metilcarbonilmetoxifenil)-3*H*-1,2-ditio-3-tiona, (MMC01109) (Adaptado de⁶⁰)

En un balón de 25 mL se hacen reaccionar, bajo agitación y en un ambiente anhidro, para lo cual se emplea una campana de CaCl₂, una disolución en THF anhidro (5 mL) que contiene 1,1 equivalentes de 5-OH-ADT, 1,1 equivalente de carbonato de calcio, 1,1 equivalente de éter corona 18-crown-6, una punta de espátula del catalizador de transferencia de fase cloruro de alquilbencildimetilamonio y desde un embudo con ecualizador se adiciona una disolución de cloroacetona, 1 equivalente en 2 mL de THF anhidro, gota a gota y durante 3 minutos. La mezcla de reacción se agita a T.A durante 72 horas. El seguimiento de la reacción se realiza por CCF en sílica con una mezcla EP:CH₂Cl₂ (30:70) como fase

móvil. Finalizada la reacción se evapora el disolvente a presión reducida. El aceite resultante se disuelve en un mínimo volumen de CH_2Cl_2 para posteriormente realizar extracciones en $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{H}_2\text{O}$ (2 x 20 mL). Las capas orgánicas combinadas se lavan con disolución saturada de NaCl y se secan con Na_2SO_4 anhidro. El producto se purifica mediante CC.



Fórmula empírica: $\text{C}_{12}\text{H}_{10}\text{O}_2\text{S}_3$

Punto de fusión ($^{\circ}\text{C}$): 144-147 $^{\circ}\text{C}$

Aspecto: cristal naranja

Rendimiento: 18 %

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ_{H} (ppm): 7,65 (d, $J = 8,9$ Hz, 2H, **Hb:Hb'**), 7,41 (s, 1H, **Ha**), 6,99 (d, $J = 8,9$ Hz, 2H, **Hc:Hc'**), 4,66 (s, 2H, **Hd**), 2,33 (s, 3H, **He**). ^{13}C -NMR δ_{C} (ppm) (a partir de experimentos de HSQC y HMBC): 25,8 (**C-He**), 72,4 (**C-Hd**), 115,5 (**C-Hc:Hc'**), 125,3 (**C_{Ar}-C-S-S**), 128,8 (**C-Hb:Hb'**), 134,6 (**C-Ha**), 160,8 (**C_{Ar}-O-CH₂**), 172,4 (**C_{Het}=C-Ha**), 203,9 (**C=O**), 215,3 (**C=S**).

MS (EI) m/z (%): 282 (M^+ , 100); 239 (15); 209 (10), 217 (54).

Síntesis de (E)-3-(2,6-dioxo-4-tiahept-3-iliden)-5-(4-(2-oxopropil)oxifenil)-3H-1,2-ditio, (MMC01103).

Calentamiento convencional

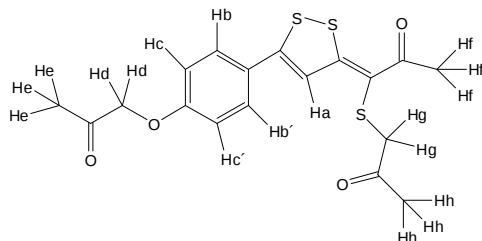
En un balón de 50 mL se hacen reaccionar, bajo agitación vigorosa y en un ambiente anhidro, para lo cual se emplea una campana de CaCl_2 , 1 equivalente de cloroacetona con 1 equivalente de 5-OH-ADT en presencia de un exceso de KI y K_2CO_3 (17 equivalentes de ambos), en 10 mL de acetona destilada. La mezcla de reacción se calienta a reflujo durante 3 horas. El seguimiento de la reacción se realiza por CCF en sílica con una mezcla de EP:AE (60:40) como fase móvil. Transcurrido el tiempo, se enfría la mezcla de reacción y se destila el disolvente a presión reducida. Posteriormente se extrae con AE (3 x 35 mL). Las capas orgánicas combinadas se lavan con agua hasta neutralidad (2 x 25 mL) y se secan con Na_2SO_4 anhidro, el disolvente es evaporado a presión reducida. El producto se purifica mediante CC en sílica.

Calentamiento asistido por MO

Una mezcla de cloroacetona (1 equivalente), 5-OH-ADT (1 equivalente), KI (17 equivalentes), K_2CO_3 (17 equivalentes) en 4 mL de acetona destilada es colocada en un reactor de teflón cerrado herméticamente. La misma se homogeniza y se la irradia con energía de microondas durante 80 segundos con una potencia de 100 W, alcanzando una temperatura máxima de 60 $^{\circ}\text{C}$. El seguimiento de la reacción se realiza por CCF en sílica con una mezcla de EP:AE (60:40) como fase móvil. Se deja enfriar la mezcla a T.A y se destila el disolvente a presión reducida. Posteriormente se extrae con AE (3 x 35 mL). Las capas orgánicas combinadas se lavan con agua hasta neutralidad (2 x 25 mL) y se secan

con Na₂SO₄ anhidro, el disolvente se evaporado a presión reducida. El producto se purifica mediante CC en sílica flash.

Estructura:



Fórmula empírica: C₁₈H₁₈O₄S₃

Punto de fusión (°C): 145-149 °C

Aspecto: cristal naranja

Rendimiento: calentamiento convencional: 54%; calentamiento MW: 82%

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ_H (ppm): 8,09 (s, 1H, **Ha**), 7,70 (d, J = 8,9 Hz, 2H, **Hb:Hb'**), 6,97 (d, J = 8,9 Hz, 2H, **Hc:Hc'**), 4,64 (s, 2H, **Hd**), 3,46 (s, 2H, **Hg**), 2,55 (s, 3H, **Hf**), 2,32 (s, 3H, **He**), 2,27 (s, 3H **Hh**).

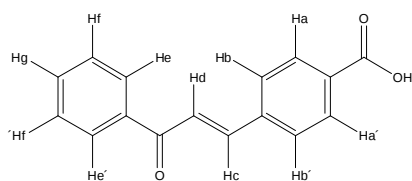
¹³C-NMR δ_C (ppm) (a partir de experimentos de HSQC y HMBC): 23,5 (**C-Hf**), 26,6 (**C-He**) 29,2 (**C-Hh**), 46,7 (**C-Hg**), 72,9 (**C-Hd**), 108,9 (C=C-S-CH₂), 115,2 (**C-Hc:Hc'**), 123,8 (**C-Ha**), 127,0 (**C_{Ar}-C-S-S**), 129,3 (**C-Hb:Hb'**), 159,9 (**C_{Ar}-O-CH₂**), 165,4 (**C_{Het}=C-Ha**), 177,6 (-S-S-**C_{Het}=C**), 193,1 (CH_{3f}-(**C=O**), 202,9 (CH_{2g}-(**C=O**)-CH_{3h}), 204,3 (CH_{2d}-(**C=O**)-CH_{3e})

MS: TOF MS ES+ m/z (%), (M+Na)⁺ = 417,0253

Síntesis de 3-(4-Carboxifenil)-1-fenil-2-propen-1-ona, (MMC01110)(Adaptado de ⁵⁸)

En un balón de 50 mL conteniendo una solución de ác-4-formilbenzoico (1 equivalente) en MeOH absoluto (20 mL) se añade NaOH (3 equivalentes). La mezcla se mantiene con agitación vigorosa hasta total disolución. Se agrega luego acetofenona (1 equivalente). La mezcal de reacción se agita a T.A durante 4 horas y posteriormente se somete a Rfl por un período de 45 minutos. El seguimiento de la reacción se realiza por CCF en sílica con una mezcla de EP:AE (60:40) como fase móvil. Después de transcurrida la reacción se agrega HCl diluido 10 % v/v y luego HCl concentrado hasta alcanzar pH ácido. El sólido amarillo se filtra y se lava con EP frío. El sólido se seca sobre sílica gel y su pureza se chequea cromatográficamente y por ¹H-RMN. En este caso se constata que el producto está suficientemente puro para la mayoría de los fines posteriores y por tanto no se procede a ningún paso de purificación adicional.

Estructura:



Fórmula empírica: $C_{16}H_{12}O_3$

Punto de fusión ($^{\circ}C$): 233-236

Aspecto: sólido amarillo

Rendimiento: 89%

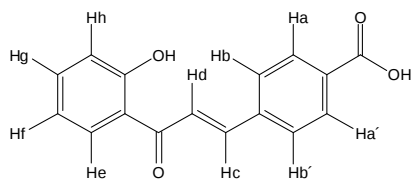
1H NMR (400 MHz, DMSO) δ_H (ppm): 8,19 (dd, $J = 8,2$ Hz, 2H, **He:He'**), 8,07 (d, $J = 15,6$ Hz, 1H, **Hd**), 8,03 (d, $J = 8,3$ Hz, 2H, **Ha:Ha'**), 8,00 (d, $J = 8,9$ Hz, 2H, **Hb:Hb'**), 7,79 (d, $J = 15,7$ Hz, 1H, **Hc**), 7,70 (t, $J = 7,3$ Hz, 1H, **Hg**), 7,60 (t, $J = 7,6$ Hz, 2H, **Hf:Hf'**). ^{13}C -NMR δ_C (ppm) (a partir de experimentos de HSQC y HMBC): 124,5 (**C-Hd**), 128,5 (**C-He:He'**), 129,1 (**C-Ha:Hb'**), 129,2 (**C-Hf:Hf'**), 129,5 (**C_{Ar}-(HO-C=O)**), 130,1 (**C-Hb:Hb'**), 134,2 (**C-Hg**), 138,7 (**C_{Ar}-(C=O)-C_{Hd}=C_{Hc}**), 140,1 (**C_{Ar}-C_{Hc}=C_{Hd}**), 143,6 (**C-Hc**), 167,5 (**OH-C=O**), 189,3 (**C=O-C_{Hd}=C_{Hc}**).

MS (EI) m/z (%): 252 (M^+ , 85), 251 (42), 207 (100), 131 (15), 105 (58), 77 (91).

Síntesis de (*E*)-3-(4-carboxifenil)-1-(2-hidroxifenil)-2-propen-1-ona, (MMC01116) (Adaptado de⁷⁴)

En un balón de 50 mL conteniendo una solución de ác-4-formilbenzoico (1 equivalente) en MeOH absoluto (20 mL) se agrega NaOH (4 equivalentes). La mezcla se mantiene con agitación vigorosa hasta total disolución. Por último se adiciona 2-hidroxiacetofenona (1 equivalente). La mezcla de reacción se agita a T.A durante 5 horas y posteriormente se somete a RfI por un lapso de 6 horas. El seguimiento de la reacción se realiza por CCF en sílica con una mezcla de EP:AE (60:40) como fase móvil. Después de transcurrida la reacción se agrega HCl diluido 10 % v/v y luego HCl concentrado hasta alcanzar pH ácido. En ese momento precipita un sólido amarillo; este se filtra y se lava con agua fría. El sólido se seca sobre sílica gel y su pureza se chequea cromatográficamente y por 1H -RMN. En este caso el producto está suficientemente puro para la mayoría de los fines posteriores y por tanto no se procede a ningún paso de purificación extra.

Estructura:



Fórmula empírica: $C_{16}H_{12}O_4$

Punto de fusión ($^{\circ}C$): 254-259

Aspecto: sólido amarillo

Rendimiento: 69%

^1H NMR (400 MHz, DMSO) δ_{H} (ppm): 12,35 (s, 1H, $\text{C}_{\text{Ar}}\text{-OH}$), 8,25 (dd, $J = 8,3, 1,6$ Hz, 1H, **He**), 8,14 (d, $J = 15,6$ Hz, 1H, **Hd**), 8,04 (d, $J = 8,8$ Hz, 2H, **Hb:Hb'**), 8,01 (d, $J = 8,7$ Hz, 2H, **Ha:Ha'**), 7,87 (d, $J = 15,6$ Hz, 1H, **Hc**), 7,59 (t, $J = 7,8$ Hz, 1H, **Hg**), 7,03 (dd, $J = 7,6, 5,8$ Hz, 2H, **Hf:Hh**). ^{13}C -NMR δ_{C} (ppm) (a partir de experimentos de HSQC y HMBC): 118,1 (**C-Hh**), 118,2 (**C-Hd**), 121,5 ($\text{C}_{\text{Ar}}\text{-(C=O)-C}_{\text{Hd}}\text{=C}_{\text{Hc}}$), 124,8 (**C-Hf**) 129,1 (**C-Hb:Hb'**), 129,6 ($\text{C}_{\text{Ar}}\text{-(HO-C=O)}$), 130,2 (**C-Ha:Ha'**), 131,4 (**C-He**), 136,9 (**C-Hg**), 139,0 ($\text{C}_{\text{Ar}}\text{-C}_{\text{Hd}}\text{=C}_{\text{Hc}}\text{-C=O}$), 143,5 (**C-Hc**), 162,1 ($\text{C}_{\text{Ar}}\text{-OH}$), 167,3 (OH-C=O), 193,8 ($\text{C=O-C}_{\text{Hd}}\text{=C}_{\text{Hc}}$).

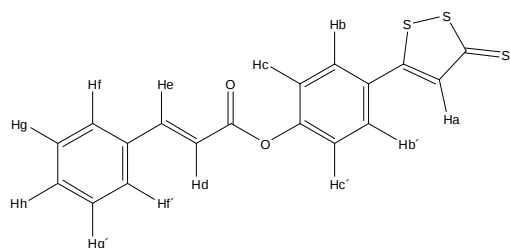
MS (EI) m/z (%): 269 (M^+ , 12), 268 (68), 267 (70), 251 (14), 223 (17), 148 (12), 147 (100), 146 (10), 131 (12), 121 (39), 120 (36), 103 (16), 77 (18).

5.1.2.2 Síntesis de agentes híbridos ditioltiona-chalcona (serie I)

Síntesis de (*E*)-cinamato de [4-(3-tioceto-3*H*-1,2-ditioil-5-il)fenilo], (MMC01126)(Adaptado de ⁶⁴)

En un balón de 50 mL conteniendo una solución de ácido cinámico (1 equivalente) en CH_2Cl_2 (15 mL) se añaden, a 0°C y bajo atmósfera de nitrógeno, DCC (1,3 equivalentes) y cantidades catalíticas de DMAP (0,1 equivalentes). Por último se incorpora a la correspondiente solución, bajo agitación vigorosa, 5-OH-ADT (1 equivalente). La mezcla de reacción se agita bajo atmósfera de nitrógeno a T.A durante 8 horas. El monitoreo de la reacción se realiza por CCF en sílica con una mezcla de EP:AE (60:40) como fase móvil. Transcurrido el tiempo de reacción, la solución se coloca en un refrigerador (0°C) por 5 horas con el objetivo de que precipite la DCU. Luego de esto, el precipitado generado se filtra en un Büchner conectado a un Kitasato y a una bomba de vacío. La DCU filtrada se lava con THF frío, en donde es insoluble, para remover trazas de productos adsorbidos. A continuación se destila la mezcla de disolventes a presión reducida. Luego se adiciona a la mezcla de reacción 30 mL HCl diluido 10 % v/v y se extrae con CH_2Cl_2 (3 x 30 mL). Las capas orgánicas combinadas se lavan con agua hasta neutralidad (2 x 20 mL) y se secan con Na_2SO_4 anhidro, el disolvente es evaporado a presión reducida. El producto se purifica mediante CC en sílica.

Estructura:



Fórmula empírica: $\text{C}_{18}\text{H}_{12}\text{O}_2\text{S}_3$

Punto de fusión (°C): 151-153

Aspecto: sólido naranja

Rendimiento: 80%

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ_{H} (ppm): 7,93 (d, $J = 16,0$ Hz, 1H, **Hd**), 7,75 (d, $J = 8,7$ Hz, 2H, **Hb:Hb'**), 7,63 (dd, $J = 6,6, 3,2$ Hz, 2H, **Hf:Hf'**), 7,50 – 7,43 (m, 4H, **Hg:Hg' + Hh + Ha**), 7,36 (d, $J = 8,5$ Hz, 2H, **Hc:Hc'**), 6,66 (d, $J = 16,0$ Hz, 1H, **He**). ^{13}C -NMR δ_{C} (ppm) (a partir de experimentos de HSQC y HMBC): 116,3 (**C-Hd**), 123,0 (**C-Hc:Hc'**), 127,9 (**C-Hb:Hb'**), 128,0 (**C_{Ar}-C-S-S**), 128,3 (**C-Hf:Hf'**), 128,5 (**C-Hg:Hg'**), 129,1 (**C-Hh**), 133,9 (**C_{Ar}-C_{He}=C_{Hd}**), 136,0 (**C-Ha**), 147,7 (**C-He**), 151,7 (**C_{Ar}-O-C=O**), 164,8 (**C=O**), 171,8 (**C_{Het}=C-Ha**), 215,5 (**C=S**).

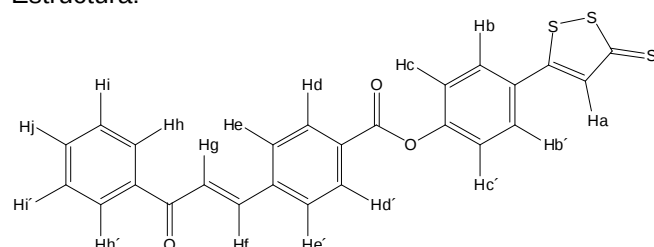
MS (EI) m/z (%): 356 (M^+ , 15), 226 (2), 161 (3), 132 (10), 131 (100), 103 (31), 77 (12).

5.1.2.3 Síntesis de agentes híbridos ditioltiona-chalcona (serie II)

Síntesis de 4-(3-fenil-3-oxopropenil)benzoato de [4-(3-tioceto-3*H*-1,2-ditiol-5-il)fenilo], (MMC01113)(Adaptado de ⁶⁴)

En un balón de 50 mL conteniendo una solución de la correspondiente chalcona (1 equivalente) en CH_2Cl_2 (15 mL) se añaden, a 0°C y bajo atmósfera de nitrógeno, DCC (1,3 equivalentes) y cantidades catalíticas de DMAP (0,1 equivalentes). Finalmente se incorpora a la solución, bajo agitación vigorosa, 5-OH-ADT (1 equivalente). La mezcla de reacción se agita bajo atmósfera de nitrógeno y T.A durante 6 horas. El monitoreo de la reacción se realiza por CCF en alúmina con una mezcla de EP:AE (60:40) como fase móvil. Transcurrido el tiempo de reacción, la solución se coloca en un refrigerador (0°C) durante toda la noche. Luego de este tiempo la DCU precipitada se filtra en un Büchner conectado a un Kitasato y a una bomba de vacío. La DCU filtrada se lava con THF frío para remover trazas de productos adsorbidos. Seguidamente se destila la mezcla de disolventes a presión reducida. Luego, a la mezcla de reacción, se le agrega 30 mL HCl diluido 10 % v/v y se extrae con CH_2Cl_2 (2 x 50 mL). Por último se realiza una extracción con NaOH diluido 10 % v/v con el objetivo de remover trazas de DCU no eliminadas previamente. Las capas orgánicas combinadas se lavan con agua hasta neutralidad (3 x 20 mL) y se secan con Na_2SO_4 anhidro, el disolvente es evaporado a presión reducida. El producto se purifica mediante CC en alúmina.

Estructura:



Fórmula empírica: $\text{C}_{25}\text{H}_{16}\text{O}_3\text{S}_3$

Punto de fusión ($^\circ\text{C}$): 198-201

Aspecto: sólido naranja

Rendimiento: 24%

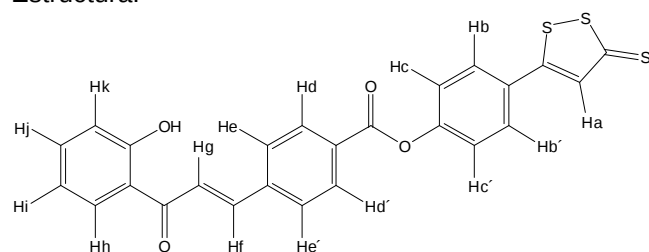
^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ_{H} (ppm): 8,27 (d, $J = 8,3$ Hz, 2H, **Hd:Hd'**), 8,08 (d, $J = 7,1$ Hz, 2H, **Hh:Hh'**), 7,88 (d, $J = 15,8$ Hz, 1H, **Hf**), 7,82 (d, $J = 8,3$ Hz, 2H, **He:He'**), 7,76 (dd, $J = 12,8, 8,8$ Hz, 2H, **Hb:Hb'**), 7,69 (d, $J = 15,7$ Hz, 1H, **Hg**), 7,64 (dt, $J = 2,6, 1,7$ Hz, 1H, **Hj**), 7,56 (t, $J = 7,5$ Hz, 2H, **Hi:Hi'**), 7,46 (s, 1H, **Ha**), 7,42 (d, $J = 8,8$ Hz, 2H, **Hc:Hc'**). ^{13}C -NMR δ_{C} (ppm) (a partir de experimentos de HSQC y HMBC): 123,1 (**C-Hc:Hc'**), 124,6 (**C-Hg**), 125,1 (**C_{Ar}-C-S-S**), 128,3 (**C-Hb:Hb'**), 128,7 (**C-Hh:Hh'**), 128,9 (**C-He:He'**), 129,1 (**C-Hi:Hi'**), 129,4 (**C_{Ar}-(O-C=O)**), 130,7 (**C-Hd:Hd'**), 134,2 (**C-Hj**), 135,4 (**C-Ha**), 137,2 (**C_{Ar}-(C=O)-C_{Hg}=C_{Hf}**), 142,1 (**C_{Ar}-C_{Hf}=C_{Hg}**), 142,8 (**C-Hf**), 152,8 (**(Hc':Hc-C)-C_{Ar}-(O-C=O)**), 163,8 (**O-C=O**), 171,3 (**C_{Het}=C-Ha**), 189,9 (**C=O-C_{Hg}=C_{Hf}**), 215,7 (**C=S**).

MS (EI) m/z (%): 460 (M^+ , 6), 235 (100), 226 (7), 207 (12), 178 (15), 105 (7), 77 (9).

Síntesis de 4-[3-(2-hidroxifenil)-3-oxopropenil]benzoato de [4-(3-tioceto-3*H*-1,2-ditioil-5-il)fenilo], (MMC01119)(Adaptado de ⁶⁴)

En un balón de 50 mL conteniendo una solución de la correspondiente chalcona (1 equivalente) en CH_2Cl_2 (15 mL) se añaden, a 0°C y bajo atmósfera de nitrógeno, DCC (1,3 equivalentes) y cantidades catalíticas de DMAP (0,1 equivalentes). Finalmente se incorpora a la solución, bajo agitación vigorosa, 5-OH-ADT (1 equivalente). La mezcla de reacción se agita bajo atmósfera de nitrógeno y T.A durante 48 horas. El monitoreo de la reacción se realiza por CCF en alúmina con una mezcla de EP:AE (60:40) como fase móvil. Transcurrido el tiempo de reacción, la solución se coloca en un refrigerador (0°C) durante toda la noche. Luego de este tiempo la DCU precipitada se filtra en un Büchner conectado a un Kitasato y a una bomba de vacío. La DCU filtrada se lava con THF frío para remover trazas de productos adsorbidos. Seguidamente se destila la mezcla de disolventes a presión reducida. Luego, a la mezcla de reacción, se le agrega 30 mL HCl diluido 10 % v/v y se extrae con CH_2Cl_2 (2 x 50 mL). Por último se realiza una extracción con NaOH diluido 10 % v/v con el objetivo de remover trazas de DCU no eliminadas previamente. Las capas orgánicas combinadas se lavan con agua hasta neutralidad (3 x 20 mL) y se secan con Na_2SO_4 anhidro, el disolvente es evaporado a presión reducida. El producto se purifica mediante CC en sílica.

Estructura:



^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ_{H} (ppm): 12,70 (s, 1H, **C_{Ar}-OH**), 8,29 (d, $J = 8,3$ Hz, 2H, **Hd:Hd'**), 8,10 (d, $J = 8,7$ Hz, 1H, **Hh**), 8,02 – 7,94 (m, 2H, **Hf + Hb**), 7,88 – 7,73 (m, 4H, **Hg + He:He' + Hb'**), 7,57 (t, $J = 7,7$ Hz, 1H, **Hj**), 7,47 (s, 1H, **Ha**), 7,42 (dd, $J = 8,5, 2,8$ Hz, 1H, **Hc**), 7,38 (d, $J = 8,6$ Hz, 1H, **Hc'**), 7,09 (d, $J = 8,2$ Hz, 1H, **Hi**), 7,01 (t, $J = 7,7$ Hz, 1H, **Hk**). ^{13}C -NMR δ_{C} (ppm) (a partir de experimentos de HSQC y

HMBC): 118,8 (C-Hi), 119,3 (C-Hk), 123,2 (C-Hc:Hc'), 127,7 (C-Hg), 128,6 (C-He:He'), 129,4 (C_{Ar}-(O-C=O)), 129,5 (C-Hb:Hb'), 129,6 (C-Hh), 130,9 (C-Hd:Hd'), 134,5 (C-Hj), 135,9 (C-Ha), 139,2 (C_{Ar}-(C=O)-C_{Hg}=C_{Hf}), 140,9 (C_{Ar}-C_{Hf}=C_{Hg}), 143,4 (C-Hf), 153,9 ((Hc':Hc-C)-C_{Ar}-(O-C=O)), 162,3 (C_{Ar}-OH), 163,8 (O-C=O), 171,9 (C_{Het}=C-Ha), 193,1 (C=O-C_{Hg}=C_{Hf}), 215,2 (C=S)

MS (EI) m/z (%): 476 (M⁺, 20), 460 (19), 226 (94), 161 (100)

Fórmula empírica: C₂₅H₁₆O₄S₃

Punto de fusión (°C): 184-187

Aspecto: sólido naranja

Rendimiento: 6 %

5.2 Evaluación biológica

Crecimiento celular

Para el crecimiento de las líneas celulares se empleó, en caso de Hepa1c1c7 medio *Alpha Minimum Essential Medium* (α-MEM) sin nucleósidos y para BprC1 *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM)⁷⁵. Ambos medios se suplementaron con suero fetal bovino (SFB) al 10% v/v, 100 U/mL de Penicilina y 100 µg/mL de Estreptomina. Las células se crecen en botellas 25-75 cm² en una atmósfera aerobia (95%), 5% de dióxido de carbono 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±2°C durante 30 minutos.

Recuento celular

Para realizar el recuento celular se emplea una cámara de Neubauer. Se adicionan 10 µL 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^{76,77}. 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 plano⁷⁸. Se completa el volumen sembrado con medio fresco hasta alcanzar 1mL y se deja en estufa de cultivo a 37 °C. A las 24 h se retira el medio y se adiciona medio fresco y se incuba nuevamente. A las 24 h 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 h en estufa de cultivo a 37 °C. Una vez cumplidas las 48 h se retira el medio de cultivo, se

tripsiniza con 100 μ L de Tripsina-EDTA y se deja 5 min en estufa de cultivo a 37 °C. Luego se adicionan 900 μ L 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 μ L 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 min 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 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.

Determinación de actividad enzimática de QR

La actividad enzimática de QR se siguió por absorbancia a 600 nm^{79,80}, empleando una solución amortiguadora Tris-HCl, 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.

Determinación de 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 Na₂HPO₄ y NaH₂PO₄ que contenía, además 1-Cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) y Glutathión reducido (GSH)⁷⁹. GST transfiere GSH a la molécula 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 específica de la enzima. Las medidas se efectúan por triplicado y se realiza una corrección por actividad espontánea en ausencia de enzima.

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

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

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 h y se realizaron ensayos a modo de ensayo primario a dosis fija de los compuestos 10 μ M.

Cuantificación de proteínas

Para la determinación de la cantidad de proteína se empleó el método del ácido bicinconínico (BCA). En este ensayo se mide la formación de Cu^+ a partir de Cu^{2+} , en solución alcalina de la proteína, empleando BCA. El átomo de Cu^{2+} proviene de una solución de sulfato cúprico que se añade al BCA, en una relación 1:9, respectivamente. Aquí tienen lugar dos reacciones que involucran el átomo de cobre. La primera de estas ocurre a bajas temperaturas y es el resultado de la interacción del cobre y el BCA con residuos de triptófano, cisteína y tirosina de las proteínas. A temperaturas elevadas, la reacción con el enlace peptídico es responsable del desarrollo de color. Incubando a 37 °C se logra incrementar la sensibilidad y disminuir las variaciones en la respuesta. El ácido bicinconínico forma un complejo con el cobre que absorbe fuertemente a 562 nm⁸¹, por lo que determinar la absorbancia a esa longitud de onda es directamente proporcional a la cantidad de proteína que hay en la muestra. Para esto debe realizarse una curva de calibración con concentraciones conocidas de una proteína estándar, como 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 concentración de proteína 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.

Ensayo de Citotoxicidad

Para determinar la citotoxicidad de los compuestos frente a las líneas celulares empleadas se utilizó el método descrito por Skehan y colaboradores⁸². 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 h se agregan 125 μ L de medio fresco y se deja 24 h más. Al día siguiente se agrega volumen adecuado según la concentración que se desee evaluar del producto y se deja incubando durante 48 h. Una vez transcurrido este tiempo se procede a descartar el medio, lavar con 200 μ L de PBS. En cámara de frío a 4 °C se agregan 50 μ L de TCA (50% v/v) y 200 μ L 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)^{78,82}, en el cual se adicionan 50 μ L de SRB 0,057 p/v en ácido acético 1% v/v y se deja 30 min. Se elimina la SRB lavando con 200 μ L 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.

Determinación de IQ

Una vez obtenidos CD e IC₅₀ de aquellos compuestos que resulten relevantes en la inducción de QR, se procede a determinar el índice de quimioprevención de los mismos. Éste se determina de la siguiente manera:³⁹

$$\text{Índice de quimioprevención (IQ)} = \text{IC}_{50}/\text{CD}$$

Análisis Estadístico

El análisis estadístico se lleva a cabo utilizando el software *OriginPro 6.1*. Todas las medidas se expresan como el valor medio $\pm$ desviación estándar (DE) de los triplicados. La DE de la tasa de actividad enzimática (tratados/control) se calcula a partir del error porcentual relativo de ambos grupos. La diferencia entre los valores de actividad enzimática de los grupos tratados y los grupos control se determina mediante un test *t* de Student. La significancia estadística se definió como $P < 0.1$.

6. Bibliografía

- (1) OMS | Cáncer <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/> (acceso Jan 23, 2013).
- (2) Alberts, B.; Johnson, A.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Walter, P. Biología molecular de la célula. En; Omega, Ed.; 2004; pp. 1314–1320.
- (3) Muñoz, A. Cáncer. Genes y Nuevas Terapias. En; Closas-Orcoven, S. ., Ed.; 1997; pp. 6–10.
- (4) Baba, A. I.; Corne, C. Tumor Cell Morphology. En *Comparative Oncology*; The Publishing House of the Romanian Academy: Bucharest, Rumania, 2007.
- (5) Registro Nacional de Cáncer-Programa Vigilancia Epidemiológica; Comisión Honoraria de Lucha Contra el Cáncer. <http://www.urucan.org.uy>.
- (6) *Agents Classified by the IARC Monographs* , Volumes 1 – 106; 2012.
- (7) Madigan, M. T.; Martinko, J. M.; Parker, J. Brock. Biología de los Microorganismos. En; Pearson-Prentice-Hall, Ed.; 2003.
- (8) J.B. Gutiérrez, A. L. de C. Fundamentos de Ciencia Toxicológica. En; Díaz de Santos, S. A., Ed.; 2001; pp. 155–177.
- (9) Surh, Y.-J. Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. *Nature Reviews Cancer* **2003**, 3, 768–80.
- (10) Chen, C.; Kong, A.-N. T. Dietary chemopreventive compounds and ARE/EpRE signaling. *Free Radical Biology & Medicine* **2004**, 36, 1505–16.
- (11) Wattenberg, L. W. Chemoprevention of Cancer. *Cancer Research* **1985**, 45, 1–8.
- (12) Duvoix, A.; Blasius, R.; Delhalle, S.; Schnekenburger, M.; Morceau, F.; Henry, E.; Dicato, M.; Diederich, M. Chemopreventive and therapeutic effects of curcumin. *Cancer Letters* **2005**, 223, 181–90.
- (13) Kelloff, G. J.; Boone, C. W.; Steele, V. E.; Crowell, J. A.; Lubet, R. A.; Greenwald, P.; Hawk, E. T.; Fay, J. R.; Sigman, C. C. Mechanistic considerations in the evaluation of chemopreventive data. *IARC Sci Publ* **1996**, 203–19.
- (14) Kakizoe, T. Chemoprevention of cancer-focusing on clinical trials. *Japanese Journal of Clinical Oncology* **2003**, 33, 421–42.
- (15) Manson, M. M.; Gescher, E.; Hudson, E.; Plummer, S. M.; Squires, M. S.; Prigent, S. Blocking and suppressing mechanisms of chemoprevention by dietary constituents. *Toxicology Letters* **2000**, 112–113, 499–505.
- (16) Naithani, R.; Huma, L. C.; Moriarty, R. M.; McCormick, D. L.; Mehta, R. G. Comprehensive Review of Cancer Chemopreventive Agents Evaluated in Experimental Carcinogenesis Models and Clinical Trials. *Current Medicinal Chemistry* **2008**, 15, 1044–1071.
- (17) Moon, Y. J.; Wang, X.; Morris, M. E. Dietary flavonoids: effects on xenobiotic and carcinogen metabolism. *Toxicology in vitro* □: an international journal published in association with BIBRA **2006**, 20, 187–210.
- (18) Xu, C.; Li, C. Y.-T.; Kong, A.-N. T. Induction of phase I, II and III drug metabolism/transport by xenobiotics. *Archives of pharmacal research* **2005**, 28, 249–68.
- (19) Murray, R. K.; Mayes, P. A.; Granner, D. K.; Rodwell, V. W. Metabolismo de xenobióticos. En *Bioquímica de Harper*; C.V., E. M. M. S. . de, Ed.; 2005.
- (20) Holtzclaw, W. D.; Dinkova-Kostova, A. T.; Talalay, P. Protection against electrophile and oxidative stress by induction of phase 2 genes: the quest for the elusive sensor that responds to inducers. *Advances in Enzyme Regulation* **2004**, 44, 335–67.
- (21) Talalay, P.; De Long, M. J.; Prochaska, H. J. Identification of a common chemical signal regulating the induction of enzymes that protect against chemical carcinogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1988**, 85, 8261–5.
- (22) Prochaska, H. J.; Talalay, P. Regulatory Mechanisms of Monofunctional and Bifunctional Anticarcinogenic Enzyme Inducers in Murine Liver Regulatory Mechanisms of Monofunctional and Bifunctional Anticarcinogenic Enzyme Inducers in Murine Liver1. *Cancer Research* **1988**, 48, 4776–4782.
- (23) Talalay, P. Mechanisms of induction of enzymes that protect against chemical carcinogenesis. *Advances in Enzyme Regulation* **1989**, 28, 237–50.
- (24) Cuendet, M.; Oteham, C. P.; Moon, R. C.; Pezzuto, J. M. Quinone reductase induction as a biomarker for cancer chemoprevention. *Journal of Natural Products* **2006**, 69, 460–3.
- (25) Yu, X.; Kensler, T. Nrf2 as a target for cancer chemoprevention. *Mutation Research* **2005**, 591, 93–102.
- (26) Tong, K. I.; Katoh, Y.; Kusunoki, H.; Itoh, K.; Tanaka, T.; Yamamoto, M. Keap1 recruits Neh2 through binding to ETGE and DLG motifs: characterization of the two-site molecular recognition model. *Molecular and Cellular Biology* **2006**, 26, 2887–900.
- (27) Cullinan, S. B.; Gordan, J. D.; Jin, J.; Harper, J. W.; Diehl, J. A. The Keap1-BTB protein is an adaptor that bridges Nrf2 to a Cul3-based E3 ligase: oxidative stress sensing by a Cul3-Keap1 ligase. *Molecular and Cellular Biology* **2004**, 24, 8477–86.

- (28) Ramos-Gomez, M.; Kwak, M. K.; Dolan, P. M.; Itoh, K.; Yamamoto, M.; Talalay, P.; Kensler, T. W. Sensitivity to carcinogenesis is increased and chemoprotective efficacy of enzyme inducers is lost in nrf2 transcription factor-deficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2001**, *98*, 3410–5.
- (29) Dinkova-Kostova, A. T.; Holtzclaw, W. D.; Cole, R. N.; Itoh, K.; Wakabayashi, N.; Katoh, Y.; Yamamoto, M.; Talalay, P. Direct evidence that sulfhydryl groups of Keap1 are the sensors regulating induction of phase 2 enzymes that protect against carcinogens and oxidants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2002**, *99*, 11908–13.
- (30) Lee, J.-S.; Surh, Y.-J. Nrf2 as a novel molecular target for chemoprevention. *Cancer Letters* **2005**, *224*, 171–84.
- (31) Wakabayashi, N.; Dinkova-Kostova, A. T.; Holtzclaw, W. D.; Kang, M.-I.; Kobayashi, A.; Yamamoto, M.; Kensler, T. W.; Talalay, P. Protection against electrophile and oxidant stress by induction of the phase 2 response: fate of cysteines of the Keap1 sensor modified by inducers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2004**, *101*, 2040–5.
- (32) Na, H.-K.; Surh, Y.-J. Modulation of Nrf2-mediated antioxidant and detoxifying enzyme induction by the green tea polyphenol EGCG. *Food and Chemical Toxicology* **2008**, *46*, 1271–8.
- (33) Sogawa, K.; Fujii-Kuriyama, Y. Ah Receptor, a Novel Ligand-Activated Transcription Factor. *Journal of Biochemistry* **1997**, *122*, 1075–1079.
- (34) Cabrera, M. Flavonoides y análogos como moduladores de enzimas detoxificantes de xenobióticos. Potenciales agentes quimiopreventivos para el cáncer., Facultad de Química-Universidad de la República. 2012.
- (35) Williams, C. A.; Grayer, R. J. Anthocyanins and other flavonoids. *Natural Product Reports* **2004**, *21*, 539–73.
- (36) Zhang, J.; Brodbelt, J. S. Structural characterization and isomer differentiation of chalcones by electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry* **2003**, *38*, 555–72.
- (37) Sinha, R.; Kipnis, V.; Subar, A. F.; Leitzmann, M. F.; Hollenbeck, A. R.; Caporaso, N. E.; Schatzkin, A.; Cross, A. J. A prospective study of meat , cooking methods , meat mutagens , heme iron , and lung cancer risks 1 – 3. *Am J Clin Nutr* **2009**, *89*, 1884–1894.
- (38) Mucci, L. A.; Wilson, K. M. Acrylamide intake through diet and human cancer risk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2008**, *56*, 6013–9.
- (39) Ramos, S. Cancer chemoprevention and chemotherapy: dietary polyphenols and signalling pathways. *Molecular Nutrition & Food Research* **2008**, *52*, 507–26.
- (40) Knekt, P.; Kumpulainen, J.; Järvinen, R.; Rissanen, H.; Heliövaara, M.; Reunanen, A.; Hakulinen, T.; Aromaa, A. Flavonoid intake and risk of chronic diseases. *The American Journal of Clinical Nutrition* **2002**, *76*, 560–8.
- (41) Uda Y.; Price K.R.; Williamson G.; Rhodes M.J.C. Induction of the anticarcinogenic marker enzyme, quinone reductase, in murine hepatoma cells in vitro by flavonoids. *Cancer Letters* **1997**, *120*, 4.
- (42) Valerio, L. G.; Kepa, J. K.; Pickwell, G. V.; Quattrochi, L. C. Induction of human NAD(P)H:quinone oxidoreductase (NQO1) gene expression by the flavonol quercetin. *Toxicology Letters* **2001**, *119*, 49–57.
- (43) Yannai, S.; Day, A. .; Williamson, G.; Rhodes, M. J. . Characterization of Flavonoids as Monofunctional or Bifunctional Inducers of Quinone Reductase in Murine Hepatoma Cell Lines. *Food and Chemical Toxicology* **1998**, *36*, 623–630.
- (44) Gerhauser, C.; Alt, A.; Heiss, E.; Gamal-Eldeen, A.; Klimo, K.; Knauf, J.; Neumann, I.; Scherf, H.-R.; Frank, N.; Bartsch, H.; Becker, H. Cancer chemopreventive activity of Xanthohumol, a natural product derived from hop. *Molecular Cancer Therapeutics* **2002**, *1*, 959–69.
- (45) Levi, M. S.; Borne, R. F.; Williamson, J. S. A review of cancer chemopreventive agents. *Current Medicinal Chemistry* **2001**, *8*, 1349–62.
- (46) Surh, Y. J.; Kim, S. G.; Liem, A.; Lee, J. W.; Miller, J. A. Inhibitory effects of isopropyl-2-(1,3-dithietane-2-ylidene)-2- [N-(4-methylthiazol-2-yl)carbamoyl]acetate (YH439) on benzo[a]pyrene-induced skin carcinogenesis and micronucleated reticulocyte formation in mice. *Mutation Research* **1999**, *423*, 149–53.
- (47) Kensler, T. W.; Curphey, T. J.; Maxiutenko, Y.; Roebuck, B. D. Chemoprotection by organosulfur inducers of phase 2 enzymes: dithiolethiones and dithiins. *Drug metabolism and Drug Interactions* **2000**, *17*, 3–22.
- (48) Ansher, S. S.; Dolan, P.; Bueding, E. Chemoprotective Effects of Two Dithiolthiones and of Butylhydroxyanisole Against Carbon Tetrachloride and Acetaminophen Toxicity. *Hepatology* **2007**, *3*, 932–935.

- (49) Bella, H.; Rahim, A. G.; Mustafa, M. D.; Ahmed, M. A.; Wasfi, S.; Bennett, J. L. Oltipraz--antischistosomal efficacy in Sudanese infected with *Schistosoma mansoni*. *The American journal of Tropical Medicine and Hygiene* **1982**, *31*, 775–8.
- (50) Epstein, J. B.; Decoteau, W. E.; Wilkinson, A. Effect of Sialor in treatment of xerostomia in Sjögren's syndrome. *Oral Surgery, Oral Medicine, and Oral Pathology* **1983**, *56*, 495–9.
- (51) Maxuitenko, Y. Y.; Libby, a H.; Joyner, H. H.; Curphey, T. J.; MacMillan, D. L.; Kensler, T. W.; Roebuck, B. D. Identification of dithiolethiones with better chemopreventive properties than oltipraz. *Carcinogenesis* **1998**, *19*, 1609–15.
- (52) Clapper, M. L. Chemopreventive activity of oltipraz. *Pharmacology & Therapeutics* **1998**, *78*, 17–27.
- (53) Elmore, E.; Luc, T. T.; Li, H. R.; Buckmeier, J. A.; Steele, V. E.; Kelloff, G. J.; Redpath, J. L. Correlation of chemopreventive efficacy data from the human epidermal cell assay with in vivo data. *Anticancer Research* **2000**, *20*, 27–32.
- (54) Wattenberg, L. W.; Bueding, E. Inhibitory effects of 5-(2-pyrazinyl)-4-methyl-1,2-dithiol-3-thione (Oltipraz) on carcinogenesis induced by benzo[a]pyrene, diethylnitrosamine and uracil mustard. *Carcinogenesis* **1986**, *7*, 1379–1381.
- (55) Kensler, T. W.; Groopman, J. D.; Sutter, T. R.; Curphey, T. J.; Roebuck, B. D. Development of cancer chemopreventive agents: oltipraz as a paradigm. *Chemical Research in Toxicology* **1999**, *12*, 113–26.
- (56) Kensler, W.; Egner, A.; Jacobson, L. P.; Prochaska, H. J.; Gordon, G. B.; Gorman, B.; Groopman, J. D. Oltipraz Modulation of Serum Trial in Qidong , People ' s Republic of China□: Albumin Adduct. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* **1998**, *7*, 127–134.
- (57) 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. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2010**, *18*, 5391–9.
- (58) Weber, W. M.; Hunsaker, L. a; Abcouwer, S. F.; Deck, L. M.; Vander Jagt, D. L. Anti-oxidant activities of curcumin and related enones. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2005**, *13*, 3811–20.
- (59) Li, L.; Rossoni, G.; Sparatore, A.; Lee, L. C.; Del Soldato, P.; Moore, P. K. Anti-inflammatory and gastrointestinal effects of a novel diclofenac derivative. *Free Radical Biology & Medicine* **2007**, *42*, 706–19.
- (60) Ducray, P.; Gauvry, N.; Pautrat, F.; Goebel, T.; Fruechtel, J.; Desaulles, Y.; Weber, S. S.; Bouvier, J.; Wagner, T.; Froelich, O.; Kaminsky, R. Discovery of amino-acetonitrile derivatives, a new class of synthetic anthelmintic compounds. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2008**, *18*, 2935–8.
- (61) Neises, B.; Steglich, W. Simple Method for the Esterification of Carboxylic Acids. *Angewandte Chemie International Edition in English* **1978**, *17*, 522–524.
- (62) 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1986**, *83*, 787–91.
- (63) Dinkova-Kostova, A. T.; Massiah, M. a; Bozak, R. E.; Hicks, R. J.; Talalay, P. Potency of Michael reaction acceptors as inducers of enzymes that protect against carcinogenesis depends on their reactivity with sulfhydryl groups. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2001**, *98*, 3404–9.
- (64) Yang, H.-M.; Shin, H.-R.; Cho, S.-H.; Bang, S.-C.; Song, G.-Y.; Ju, J.-H.; Kim, M.-K.; Lee, S.-H.; Ryu, J.-C.; Kim, Y.; Jung, S.-H. Structural requirement of chalcones for the inhibitory activity of interleukin-5. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2007**, *15*, 104–11.
- (65) Kodela, R.; Chattopadhyay, M.; Kashfi, K. NOSH-Aspirin: A Novel Nitric Oxide-Hydrogen Sulfide-Releasing Hybrid: A New Class of Anti-inflammatory Pharmaceuticals. *Medicinal Mhemistry Letters* **2012**, *3*, 257–262.
- (66) Liu, W.; Wang, D.; Liu, K.; Sun, X. Nrf2 as a converging node for cellular signaling pathways of gasotransmitters. *Medical Hypotheses* **2012**, *79*, 308–10.
- (67) Burgot, G.; Bona, M.; Christen, M. O.; Burgot, J. L. First relationships between detoxication properties of some 1,2-dithiole-3-thiones and their log P. *International Journal of Pharmaceutics* **1996**, *129*, 295–299.
- (68) 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. *Molecular Pharmacology* **2008**, *74*, 1381–91.
- (69) Sabzevari, O.; Galati, G.; Moridani, M. Y.; Siraki, A.; O'Brien, P. J. Molecular cytotoxic mechanisms of anticancer hydroxychalcones. *Chemico-Biological Interactions* **2004**, *148*, 57–67.
- (70) Havsteen, B. H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology & Therapeutics* **2002**, *96*, 67–202.

- (71) Long, M. J. De; Dolan, P.; Santamaria, A. B.; Bueding, E. I., 2-Dithiol-3-thione analogs: effects on NAD (P) H: quinone reductase and glutathione levels in murine hepatoma cells. *Carcinogenesis* **1986**, 7, 977–980.
- (72) Jiang, Z.-Q.; Chen, C.; Yang, B.; Hebbar, V.; Kong, A.-N. T. Differential responses from seven mammalian cell lines to the treatments of detoxifying enzyme inducers. *Life Sciences* **2003**, 72, 2243–53.
- (73) Song, L. L.; Kosmeder, J. W.; Lee, S. K.; 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 Research* **1999**, 59, 578–85.
- (74) Perrin, D.; Armarego, W. *Purification of laboratory chemicals*; Butterworth-Heinemann, Ed.; 4th ed.; 1966.
- (75) ATCC: The Global Bioresource Center <http://www.atcc.org/> (acceso Mar 13, 2013).
- (76) Louis, K. S.; Siegel, A. C. Cell viability analysis using trypan blue: manual and automated methods. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* **2011**, 740, 7–12.
- (77) Strober, W. Trypan blue exclusion test of cell viability. *Current protocols in immunology / edited by John E. Coligan ... [et al.]* **2001**, Appendix 3, Appendix 3B.
- (78) Houghton, P.; Fang, R.; Techatanawat, I.; Steventon, G.; Hylands, P. J.; Lee, C. C. The sulphorhodamine (SRB) assay and other approaches to testing plant extracts and derived compounds for activities related to reputed anticancer activity. *Methods (San Diego, Calif.)* **2007**, 42, 377–87.
- (79) M, L. E.; R, P. A. A.; G, F. A. A. Valoración de dos métodos de tinción en ensayos de citotoxicidad sobre líneas celulares tumorales Assessing two staining methods for cytotoxicity tests on tumor cell lines. *Rev. Colomb. Biotecnol.* **2009**, 11, 49–56.
- (80) Jiang, Z.-Q.; Chen, C.; Yang, B.; Hebbar, V.; Kong, A.-N. T. Differential responses from seven mammalian cell lines to the treatments of detoxifying enzyme inducers. *Life Sciences* **2003**, 72, 2243–2253.
- (81) Olson, B. J. S. C.; Markwell, J. Assays for determination of protein concentration. *Current protocols in protein science / editorial board, John E. Coligan ... [et al.]* **2007**, Chapter 3, Unit 3.4.
- (82) Skehan, P.; Storeng, R.; Scudiero, D.; Monks, A.; McMahon, J.; Vistica, D.; Warren, J. T.; Bokesch, H.; Kenney, S.; Boyd, M. R. New Colorimetric Cytotoxicity Assay for Anticancer-Drug Screening. *Journal of the National Cancer Institute* **1990**, 82, 1107–1112.

7. Agradecimientos

A mis padres Antonio y Cristina, por acompañarme y brindarme su apoyo incondicional en todos los momentos.

A mi hermanita, sobrino, cuñado y abuelas por su apoyo y cariño en todo momento

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 constante durante el desarrollo de la misma.

A mi amigo y tutor de tesis Mauricio Cabrera, por su confianza, paciencia, dedicación y ante todo su mentalidad positiva en todo momento.

A mis compañeros y amigos del laboratorio con quienes compartimos el trabajo diario, y por estar presentes en los buenos momentos, y también en los difíciles.

A Fernanda por acompañarme y ayudarme en todo momento

A las instituciones que han permitido y contribuido al desarrollo de la tesina:

- Facultad de Química y Facultad de Ciencias, Universidad de la República.*
- Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII)-beca de iniciación a la investigación.*
- Comisión Sectorial de Investigación Científica, (CSIC), Uruguay.*

Muchas Gracias a todos por su aporte