



# *PERFIL METABÓLICO Y MUTAGÉNICO DE UN FLAVONOIDE PARA EL TRATAMIENTO DE LA ESCLEROSIS LATERAL AMIOTRÓFICA*

**Nadia Presa Gau**

Tutora: Dra. Mercedes González

Co-tutor: Dr. Hugo Cerecetto



Laboratorio de Química Orgánica, Grupo de Química Medicinal, Facultad de Ciencias, Universidad de la República (UdelaR)

Tesina de Grado de la Licenciatura en Ciencias Biológicas

Orientación: Fisiología y Nutrición

Tribunal: Dra. Leonor Thomson, Dr. Pablo Cabral

Montevideo, Marzo 2015

**AGRADECIMIENTOS**

*Agradezco a:*

*Dios por sus bendiciones y por su compañía día a día*

*Mis tutores, Mercedes González y Hugo Cerecetto, por permitirme realizar la pasantía de grado en el Laboratorio de Química Orgánica y guiarme en la misma*

*Mauricio Cabrera, por sus enseñanzas en el transcurso de la pasantía*

*Martín Gabay por la ayuda con el ensayo de Ames*

*Los compañeros del Laboratorio de Química Orgánica, por la compañía y colaboración*

*Los compañeros del Laboratorio de Síntesis y del Laboratorio de Microbiología de Suelos del Centro de Investigaciones Nucleares, y a los compañeros del Laboratorio de Físicoquímica Biológica y de Enzimología de Facultad de Ciencias*

*A Nicolás Cataldo, Leonardo Santos y Matías Möller por la ayuda con en el equipo de cromatografía (HPLC)*

*A mis padres Carlos y Sonia, a mis hermanos Simón, Leandro y Germán, por el amor brindado*

*A mis amistades*

*Profesores Elizabeth y Washington*

*Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII) por la beca de Iniciación a la Investigación y al Fondo de Solidaridad por el apoyo económico*

*A los integrantes del tribunal por la corrección de la tesis: Dra. Leonor Thomson y Dr. Pablo Cabral*

ÍNDICE	PÁGINA
1. RESUMEN .....	3
2. INTRODUCCIÓN .....	5
2.1. Esclerosis lateral amiotrófica .....	5
2.1.1. Modelos animales .....	7
2.1.2. Hipótesis.....	7
2.1.2.1. Enzima SOD1.....	9
2.1.2.2. Excitotoxicidad por glutamato.....	10
2.1.2.3. Neurofilamentos.....	10
2.1.2.4. Agregación proteica.....	11
2.1.2.5. Neuroinflamación.....	12
2.1.2.6. Astrocitos aberrantes, astrogliosis y microgliosis.....	12
2.1.2.7. Estrés oxidativo.....	13
2.1.3. Farmacoterapia.....	14
2.2. Flavonoides.....	16
2.2.1. Chalconas.....	17
2.3. Metabolismo y enzimas metabolizadoras.....	18
2.3.1. Metabolismo de tioles.....	22
2.4. Descubrimiento de un fármaco.....	23
2.5. Estudios preclínicos.....	25
2.5.1. Estudios de metabolismo <i>in vitro</i> .....	25

2.6. Estudio de mutagenicidad mediante ensayo de Ames de toxicidad.....	26
2.6.1. Ensayo de toxicidad en bacterias <i>Salmonella typhimurium</i> .....	26
2.6.2. Ensayo de Ames.....	26
3. ANTECEDENTES.....	30
4. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	31
4.1. Hipótesis.....	31
4.2. Objetivo general.....	31
4.3. Objetivos específicos.....	31
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	32
5.1. Preparación de Chalcona CH38 y sus potenciales metabolitos.....	32
5.1.1. Generalidades.....	32
5.1.2. (E)-3-4-(metiltio)fenil)-1-fenilprop-2-en-1-ona (CH38).....	32
5.1.3. Potenciales metabolitos de CH38.....	33
5.1.3.1. (E)-3-(4-metilsulfinil)fenil)-1-fenilprop-2-en-1-ona (S2).....	33
5.1.3.2. (E)-3-(4-metilsulfonil)fenil)-1-fenilprop-2-en-1-ona (S1).....	33
5.2. Cuantificación de proteínas.....	34
5.3. Determinación de la actividad glutatión- <i>S</i> -transferasa.....	34
5.4. Ensayo de metabolización <i>in vitro</i> .....	35
5.5. Análisis por cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC).....	36
5.6. Ensayo de toxicidad.....	36
5.7. Estudio de mutagenicidad mediante ensayo de Ames.....	37

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	41
6.1. Análisis del metabolismo de CH38 por cromatografía en capa fina.....	41
6.2. Análisis espectrofotométricos.....	44
6.3. Análisis por HPLC del metabolismo de CH38.....	47
6.4. Ensayo de Ames.....	59
6.4.1. Ensayo de toxicidad.....	59
6.4.2. Estudio de mutagenicidad mediante ensayo de Ames.....	61
7. CONCLUSIONES.....	68
8. PERSPECTIVAS.....	68
9. BIBLIOGRAFÍA.....	70
10. ANEXO.....	79
10.1. Preparación de soluciones stock para el ensayo de metabolización.....	79
10.2. Ensayo de Ames.....	79
10.2.1. Cultivo bacteriano.....	79
10.2.2. Medio mínimo selectivo para revertientes His+.....	79
10.2.3. Solución de MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O.....	79
10.2.4. Solución de Glucosa.....	79
10.2.5. Medio de cultivo Oxoid N°2.....	79
10.2.6. Agar.....	80
10.2.7. Agar para el ensayo de Ames.....	80
10.2.8. Amortiguador fosfato para Ames.....	80
10.2.9. Mezcla S9.....	80

10.2.10. Soluciones de histidina/biotina.....80

## 1. RESUMEN

**Antecedentes:** La esclerosis lateral amiotrófica (ELA) es una enfermedad neurodegenerativa fatal del sistema motor humano que se presenta en la etapa adulta. Esta enfermedad se caracteriza por atrofia muscular y parálisis debido a la muerte de las motoneuronas superiores de la corteza cerebral y de las motoneuronas inferiores del tronco cerebral y del asta anterior de la médula espinal. La mayoría de casos corresponden a ELA esporádica de etiología desconocida, mientras que un porcentaje menor corresponde a casos de ELA familiar, presentando mutaciones en el gen codificante de la enzima antioxidante superóxido dismutasa 1 de cobre/zinc (SOD1), ambas son clínica y patológicamente indistinguibles. Los posibles mecanismos del inicio y progresión de la enfermedad incluyen efectos tóxicos de la SOD1 mutada, estrés oxidativo, mal plegamiento y agregación de proteínas, excitotoxicidad por glutamato, neuroinflamación, influencia de astrocitos aberrantes (AbA), entre otras causas. Las células AbA producen factores (excitotoxinas, citoquinas) que dañan a las motoneuronas. El único tratamiento actual, aprobado por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA, por sus siglas en inglés), es riluzol (un derivado de benzotiazol) que enlentece modestamente la progresión de la enfermedad. Recientemente, estudios *in vitro* ha demostrado que un flavonoide de la quimioteca del grupo de Química Medicinal, Facultad de Ciencias, presentó toxicidad selectiva hacia las células AbA frente a astrocitos fenotipo silvestre lo que ha llevado a pensar en su uso como agente para tratar ELA.

**Objetivos:** Esta tesina se centra en la realización de ensayos preclínicos de estudios de metabolismo *in vitro* y de mutagenicidad mediante ensayo de Ames de un flavonoide como potencial fármaco para el tratamiento de la ELA.

**Métodos:** Para los estudios de metabolismo *in vitro* del potencial fármaco se utilizaron las fracciones citosólica y microsomal, de hepatocitos de hígado de rata. La metabolización se llevó a cabo en diferentes tiempos de incubación, y el seguimiento se realizó empleando técnicas de cromatografía en capa fina y cromatografía líquida de alta resolución. Para determinar si el potencial fármaco y sus principales metabolitos presentaban o no capacidad mutagénica, se realizó el ensayo de Ames utilizando cinco cepas bacterianas

de *Salmonella typhimurium* (*S. typhimurium*) TA98, TA100, TA102, TA1535 y TA1537.

**Resultados:** Se evidenció la formación de dos metabolitos principales y de otros metabolitos que no fueron identificados. Además se observó una mayor metabolización en la fracción microsomal que en la fracción citosólica. Por otro lado, ninguno de los productos evaluados, el flavonoide ni sus metabolitos principales, presentó capacidad mutagénica.

**Conclusiones:** Los resultados satisfactorios obtenidos en estos ensayos preclínicos permiten proseguir con otros estudios preclínicos y clínicos, con la esperanza de que resulte en un tratamiento farmacológico eficaz para las personas que padecen esta enfermedad.

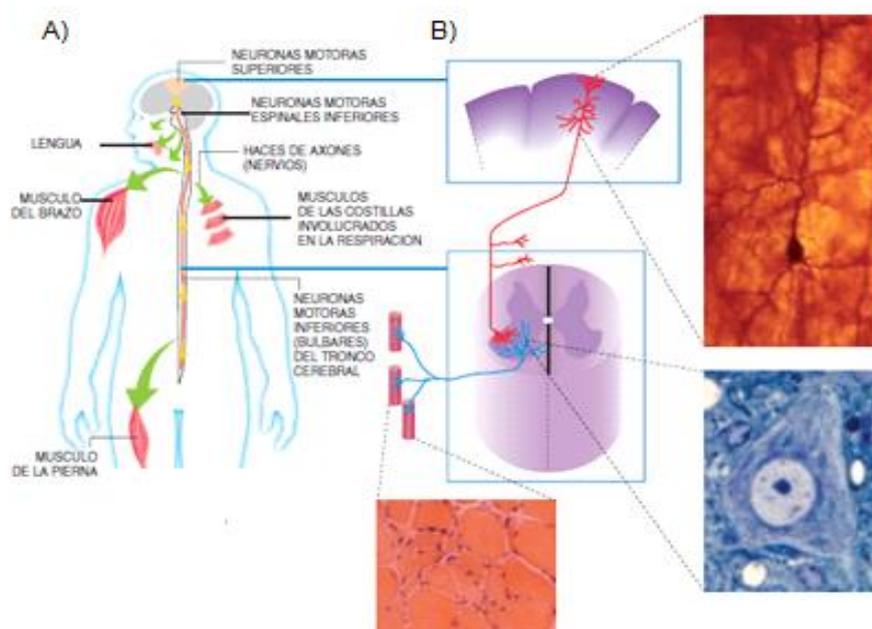
**Palabras clave:** flavonoides, metabolismo, ensayo de Ames, ensayos preclínicos, astrocitos aberrantes, esclerosis lateral amiotrófica, neurodegeneración.

## 2. INTRODUCCIÓN

### 2.1. Esclerosis lateral amiotrófica

La esclerosis lateral amiotrófica (ELA) o enfermedad de Lou Gehrig, así conocida en los Estados Unidos por el famoso jugador de béisbol, fue descrita por Charles Bell en 1830 y por Jean Martin Charcot en 1865 **(Collado-Vázquez, 2014)**. Es una enfermedad neurodegenerativa fatal e idiopática del sistema motor humano, se inicia en la etapa adulta, y se caracteriza por atrofia muscular y parálisis debido a la degeneración progresiva de las motoneuronas superiores (MNS) de la corteza cerebral y de las motoneuronas inferiores (MNI) del tronco cerebral y del asta anterior de la médula espinal (Figura 2.1) **(Gordon, 2013; Trojsi y cols, 2013; Mancuso y cols, 2012; Borrás y cols, 1998)**. La incidencia de la ELA es de 0.4-2.4 casos cada 100.000 habitantes por año, y la prevalencia es de 4-6 casos cada 100.000 habitantes. La enfermedad surge alrededor de los 56 años, es poco común antes de los 40 o después de los 70 años, y existe una forma juvenil antes de los 25 años **(Collado-Vázquez y Carillo, 2014)**. El 90% de los casos corresponden a ELA esporádica (ELAe) con etiología desconocida, mientras que un 10 % de casos corresponden a ELA hereditaria o familiar (ELAf) con un patrón de herencia autosómico dominante, existiendo mutaciones en el gen codificante de la enzima antioxidante superóxido dismutasa 1 de cobre/zinc (SOD1), tanto en la ELAf como en la ELAe **(Gordon, 2013; Trojsi y cols, 2013; Mancuso y cols, 2012; Vela y cols, 2012)**. La ELAf y la ELAe son clínica y patológicamente indistinguibles **(Ruddy y cols, 2003)**. Existe una forma de ELAe en habitantes del Pacífico Occidental debido al consumo de un vegetal que acumula un tóxico cianobacteriano que actúa como un agonista del receptor glutamatérgico. Esto sugiere que el desarrollo de esta forma de ELAe estaría vinculado con la excitotoxicidad mediada por glutamato **(Prida, 2009)**. Existe una mayor frecuencia de ELA en hombres que en mujeres, y los rangos de supervivencia abarcan de meses a décadas, usualmente menos de tres años desde que aparecieron los síntomas. Las manifestaciones de la ELA comienzan en los miembros, usualmente en los brazos, en alrededor de dos tercios de los pacientes. Los primeros síntomas consisten en unilaterales y

focales. Los movimientos de los ojos son preservados hasta los estadios avanzados (**Gordon, 2013**). Se produce la retracción del axón motor en la sinapsis neuromuscular (denervación) provocando parálisis, esta denervación de los músculos respiratorios y del diafragma es el evento fatal (**Boillée y cols, 2006**). La degeneración de las MNS provoca espasticidad (aumento del tono muscular), hiperreflexia (exaltación de reflejos tendinosos), enlentecimiento del habla, signos de Hoffman o de Babinski; mientras que la degeneración de las MNI provoca atrofia muscular, fasciculaciones (contracciones musculares involuntarias) y debilidad muscular. No se produce deterioro intelectual, en los órganos de los sentidos, esfínteres o en la función sexual (**Fallas, 2010**). No existe cura eficaz para la ELA, el objetivo del cuidado clínico es mantener la calidad de vida y prolongar la vida del individuo. Muchas terapias con ansiolíticos y analgésicos aportan bienestar en los estadios avanzados de la enfermedad (**Gordon, 2013; Trojsi y cols, 2013**).



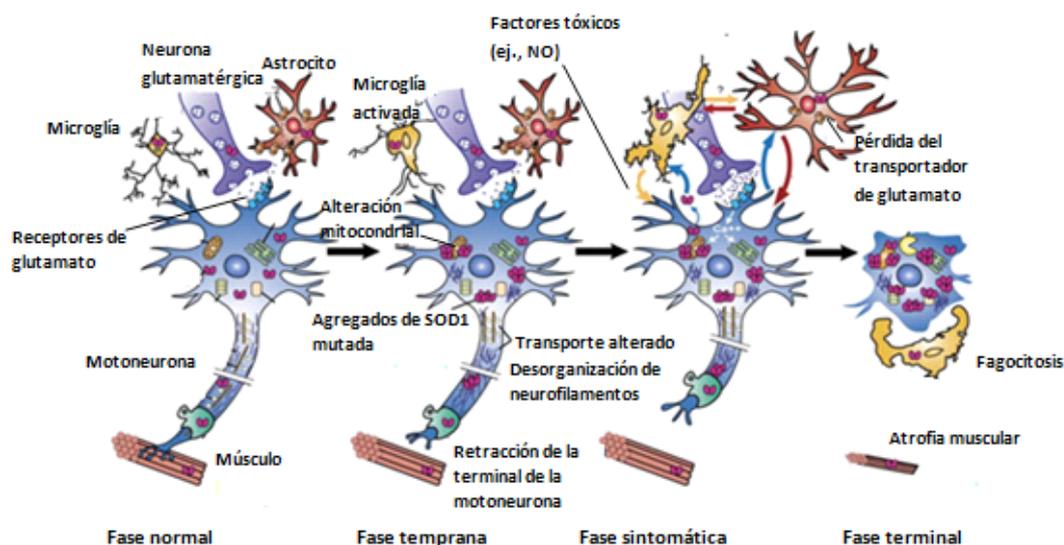
**Figura 2.1. Células y regiones afectadas por la ELA. A)** Regiones musculares afectadas por la ELA. **B)** Esquema de la localización y conexiones de las MNs de la corteza cerebral (color rojo) y del asta anterior de la médula espinal (color azul) y las proyecciones neuromusculares que envían. Se muestran imágenes de las células afectadas, la imagen correspondiente al músculo muestra fibras musculares anguladas y de pequeño calibre debido a la atrofia muscular por la denervación. Extraído de **Esquerda, 2005**.

### 2.1.1. Modelos animales

Los modelos de animales transgénicos se utilizan para estudiar la fisiología de la ELA e investigar nuevas terapias (**Gordon, 2013; Mancuso y cols, 2012; Esquerda, 2005; Robberecht y cols, 2000**). Estos modelos (ratas y ratones) expresan la SOD1 mutada y desarrollan un síndrome motor que se asemeja al trastorno humano con respecto a los síntomas y mecanismos patogénicos (**Díaz-Amarilla y cols, 2011; Ripps y cols, 1995**). El modelo más usado es un ratón transgénico con un cambio del aminoácido glicina por alanina en el codón 96 del gen *SOD1* (*SOD1 G93A*). El fenotipo de este modelo recapitula varios rasgos clínicos e histopatológicos de la ELAf y de la ELAe (**Mancuso y cols, 2012**), sin embargo, no existe un modelo que recapitule totalmente la condición humana y muchos estudios positivos en animales podrían no ser replicados en humanos (**Gordon, 2013**).

### 2.1.2. Hipótesis

Los posibles mecanismos del inicio y progresión de la enfermedad incluyen efectos tóxicos de la SOD1 mutada, estrés oxidativo por la generación de radicales libres, mal plegamiento y agregación de proteínas, la desorganización de filamentos intermedios del citoesqueleto celular, transporte axonal alterado, excitotoxicidad mediada por glutamato, alteraciones en la regulación del calcio intracelular, fragmentación del aparato de Golgi, neuroinflamación, alteración mitocondrial y apoptosis (Figura 2.2) (**Gordon, 2013; Mancuso y cols, 2012; Prida, 2009; Orient y cols, 2006; Rowland y Shneider, 2001**).



**Figura 2.2. Esquema de la evolución de la degeneración de las MNs y activación glial iniciada por SOD1 mutada.** Se presentan cuatro fases: normal, temprana, sintomática y terminal. Adaptado de **Boillée y cols, 2006**.

Se observan inclusiones ubiquitinadas, cuerpos tipo Lewy, cuerpos de Bunina, en las neuronas y glía (**Rowland y Shneider, 2001**). Se han planteado causas ambientales como la exposición a metales pesados (mercurio, selenio, zinc y cobre), tóxicos de cianobacterias, pesticidas, campos electromagnéticos, infecciones virales y enfermedades priónicas, factores autoinmunes (**Trojsi y cols, 2013; Orient y cols, 2006**), mutaciones en el factor neurotrófico de crecimiento endotelial vascular (**Boillée y cols, 2006**). La SOD1 mutada puede estar implicada en la coagregación de componentes citoplasmáticos, inhibición de la degradación de proteínas celulares por la alteración del proteosoma, saturación de chaperonas citoplasmáticas que catalizan el plegamiento de proteínas, daño a las mitocondrias por agregación en la superficie citoplasmática y/o transporte al espacio intermembrana, puede interferir con los elementos de la cadena de transporte de electrones alterando la fosforilación oxidativa generadora de ATP, bloqueo de la maquinaria de importación nuclear (**Boillée y cols, 2006**), la pérdida del transportador de glutamato glial EAAT2 resultando en una elevada concentración de glutamato en el medio extracelular (**Robberecht y cols, 2000**). Los astrocitos con SOD1 mutada liberan factores que inducen la muerte de las MNs, muestran alteración mitocondrial, producción de

superóxido y de óxido nítrico, liberan citoquinas alteradas. Los astrocitos de la médula espinal asumen un fenotipo neurotóxico en respuesta al ATP extracelular, conduciendo a la muerte de las MNs (**Gandelman y cols, 2010**). La secreción reducida de moléculas tróficas y la liberación de productos tóxicos por escape celular o lisis (óxido nítrico, TNF $\alpha$ , SOD1 mutada) alteran el entorno celular (**Boillée y cols, 2006**).

### 2.1.2.1. Enzima SOD1

El gen *SOD1* localizado en el cromosoma 21 está compuesto por cinco exones que codifican un péptido de 153 aminoácidos: la enzima detoxificante SOD1 homodimérica que incorpora zinc (Zn) y cobre (Cu); se ubica en el citosol y se expresa de manera ubicua, transforma los aniones superóxido (bioproductos naturales de la respiración) en agua o peróxido de hidrógeno (**Boillée y cols, 2006; Liu y cols, 2004; Robberecht y cols, 2000**). El átomo de Cu en el sitio activo de la enzima media la catálisis. Una proteína chaperona de Cu incorpora iones de cobre en la enzima SOD1, la alteración del gen de esta proteína reduce la actividad de la SOD1 (**Rowland y Shneider, 2001**). La incorporación ineficiente de Cu en SOD1 mutada conduce al daño celular y a la muerte de las MNs (**Boillée y cols, 2006**). En la ELAf, la enzima SOD1 se encuentra mutada en las neuronas, neuroglía y otros tipos celulares. La actividad enzimática disminuye, aumenta o es alterada (**Esquerda, 2005**). Las mutaciones en SOD1 originan una acumulación de peróxido de hidrógeno que podría ocasionar la degeneración de las MNs por un mecanismo de estrés oxidativo (**Orient y cols, 2006**). Estudios *in vitro* revelaron un aumento de la afinidad de SOD1 mutada por peróxido de hidrógeno resultando en la formación de radicales hidroxilo (**Yoshihara y cols, 2002**). Las enzimas SOD1 mutadas podrían plegarse de forma incorrecta formando agregados que incluirían a otras proteínas celulares inhibiendo sus funciones (**Prida, 2009; Esquerda, 2005**). SOD1 mutada activa varios mecanismos patogénicos que incluyen una química redox alterada, agregación proteica, estrés del retículo endoplasmático (RE), disfunción mitocondrial, transporte axonal alterado, inflamación (**Díaz y cols, 2011**).

### 2.1.2.2. Excitotoxicidad por glutamato

Pacientes con ELAe presentan niveles elevados del neurotransmisor excitador glutamato en el fluido cerebroespinal, elevando los niveles de calcio intracelulares debido a un efecto tóxico en las mitocondrias, esenciales para la homeostasis de calcio **(Rowland y Shneider, 2001)**. Los transportadores presentes en las neuronas y en los astrocitos, se encargan de reintroducir el glutamato al interior celular luego de ser liberado al espacio extracelular, durante el potencial de acción. Durante el proceso de excitotoxicidad, las concentraciones elevadas de glutamato en el espacio extracelular, conducen a la muerte neuronal por el aumento intracelular de los iones sodio y calcio. La alta concentración de calcio daña las mitocondrias por la producción de radicales libres provocando estrés oxidativo, se activan proteasas, lipasas, sintasa de óxido nítrico y otras enzimas **(Esquerda, 2005)**. Se ha encontrado una reducción en la recaptación de glutamato, un déficit en el sistema de transporte de sodio encargado de la renovación de glutamato. La toxicidad por glutamato podría ser revertida con antagonistas de glutamato y agentes que reduzcan su liberación como el fármaco riluzol **(Borrás y cols, 1998)**. Los astrocitos median la recuperación de glutamato mediante el transportador EAAT2 (GLT-1 en roedores). En la ELA el transportador EAAT2 se encuentra en baja concentración y se reduce la recuperación de glutamato extracelular, provocando apoptosis. Los fármacos que aumentan la actividad del transportador EAAT2 extienden la supervivencia de los animales afectados **(Boillée y cols, 2006)**.

### 2.1.2.3. Neurofilamentos

Los neurofilamentos (NFs) tienen un papel en el transporte axonal y en determinar la forma de las células y el calibre de los axones **(Rowland y Shneider, 2001)**. Los NFs son heteropolímeros compuestos por tres subunidades: NF ligera (NF-L), NF mediana (NF-M), y NF pesada (NF-H) **(Boillée y cols, 2006)**. En la ELA se observa la acumulación de NFs del citoesqueleto, hiperfosforilados en el soma y en el axón. Se han detectado algunas mutaciones en las proteínas que componen los neurofilamentos **(Esquerda, 2005)**. La alteración en los NFs podría ser la causa o un

subproducto de la degeneración neuronal. Se han encontrado mutaciones en el gen codificante de las subunidades NF-H y NF-L en pacientes con ELAe y ELAf. Los NFs desorganizados podrían impedir el transporte axonal de moléculas. En ratones con SOD1 mutada, la eliminación de la expresión de la subunidad NF-L, o la sobreexpresión de la subunidad NF-H, produce mejorías. La proteína periferina que compone los filamentos intermedios, normalmente expresada en las MNs, se encuentra junto con los NFs en inclusiones neuronales de pacientes con ELAe y en ratones con SOD1 mutada. Niveles de periferina aumentan en respuesta a la lesión celular o a citoquinas inflamatorias. La sobreexpresión de periferina en ratones indujo la degeneración de axones motores. En ratones que carecen de las subunidades NF-L y sobreexpresan periferina ocurre la muerte de MNs (**Rowland y Shneider, 2001**). Se han identificado algunas mutaciones en el gen codificante de la periferina relacionadas con ELAe (**Prida, 2009**).

### 2.1.2.4. Agregación proteica

Existe agregación de proteínas en diferentes desórdenes neurodegenerativos como en las enfermedades de Alzheimer, Parkinson, Huntington, y ELA. La SOD1 mutada mal plegada es propensa a agregación (**Boillée y cols, 2006**). La agregación de proteínas mal plegadas puede influir en las proteínas nativas cercanas modificando su conformación. Los agregados proteicos en las MNs son asociados con otros procesos patofisiológicos como la alteración mitocondrial, excitotoxicidad por glutamato, y la inducción de mediadores inflamatorios (**Gordon, 2013**). Los cuerpos de inclusión consisten en agregados de proteínas ubiquitinadas rodeadas por filamentos desorganizados, presentes en MNs en la ELAe y la ELAf. La producción de altas cantidades de SOD1 mutada se convierte en una carga en el proceso de degradación proteica mediante la vía del proteosoma, y se acumula en el interior celular. Es posible que formas de ELAf y ELAe compartan un mecanismo común involucrando la disfunción de la vía del proteosoma (**Niwa y cols, 2002**).

### 2.1.2.5. Neuroinflamación

En las enfermedades de Parkinson, Alzheimer y ELA, se produce un proceso inflamatorio, ocurre la invasión por leucocitos y los macrófagos residentes entran en acción. Hay un incremento de mediadores inflamatorios TNF- $\alpha$ , interleucinas, COX-2, prostaglandina E2. Para tratar la neuroinflamación se utilizan inhibidores de alguno de estos mediadores. Los anticuerpos unidos a los canales de Ca en la ELAe, se activarían incrementando el ingreso de Ca a la célula provocando daño celular **(Esquerda, 2005)**. La activación de diferentes caspasas en la médula espinal de ratones con SOD1 mutada, inicia el proceso de apoptosis. La activación de la caspasa 1 en las MNs contribuye al proceso inflamatorio involucrando la activación de la astrogliá y microglía en ratones con SOD1 mutada. Se producen citoquinas, proteasas, moléculas citotóxicas reactivas pequeñas, radicales derivados del oxígeno, TNF $\alpha$  **(Yoshihara y cols, 2002)**.

### 2.1.2.6. Astrocitos aberrantes, astrogliosis y microgliosis

Los astrocitos interactúan con las neuronas brindando apoyo estructural, metabólico y trófico, modulan la excitabilidad neuronal y la neurotransmisión controlando los niveles extracelulares de iones y neurotransmisores **(Barbeito y cols, 2004)**. Un tipo de astrocito con rasgos fenotípicos aberrantes (astrocitos aberrantes, AbA por sus siglas en inglés), ejercen un ambiente no permisivo para el crecimiento y la diferenciación de las MNs. Las células AbA parecen ser una subclase de astrocitos productores de factores (citoquinas, excitotoxinas, factores tróficos) que pueden dañar a las MNs. Las células AbA exhiben una tasa de proliferación aumentada y ausencia de senescencia replicativa, presentan marcadores antigénicos al igual que los astrocitos indiferenciados, alteración del ensamblaje de los neurofilamentos, hemicanales abiertos al espacio extracelular liberando ATP, niveles bajos del transportador de glutamato GLT1 astrogliá **(Díaz-Amarilla y cols, 2011)**. En respuesta a la lesión, los astrocitos y la microglía exhiben cambios fenotípicos caracterizados como astrocitosis y microgliosis, respectivamente. Los astrocitos responden al daño en el SNC mediante la proliferación y adoptando un fenotipo reactivo caracterizado morfológicamente por cuerpos celulares y

núcleos hipertróficos y procesos con distintas longitudes y grosores con alto contenido de proteína ácida fibrilar glial, expresan diferentes marcadores como proteínas del citoesqueleto, moléculas de la matriz y de la superficie celular glial, proteasas, inhibidores de proteasa, factores de crecimiento, mediadores inflamatorios (COX-2, iNOS y NOS), especies reactivas de oxígeno (EROS) y de nitrógeno, inclusiones hialinas citoplásmicas, citoquinas y factores tróficos (FasL, TNF- $\alpha$  y NGF), son capaces de activar la apoptosis. El estrés oxidativo causado por la producción de óxido nítrico, peroxinitrito y de otras especies reactivas de nitrógeno por MNs dañadas puede ser un mecanismo para la activación de astrocitos en la ELA. La producción de óxido nítrico o peroxinitrito por los astrocitos induce daño a las mitocondrias y potencia la excitotoxicidad. La enzima COX-2 cataliza la síntesis de prostaglandina E2 inflamatoria estimulando la liberación de glutamato. La microglía activada secreta péptidos proinflamatorios, óxido nítrico, y excitotoxinas que inducen la astrocitosis o agravan el daño neuronal. El óxido nítrico se difunde a través de las membranas celulares y se combina con superóxido para formar peroxinitrito un agente oxidante fuerte. El peroxinitrito probablemente da cuenta de la citotoxicidad del óxido nítrico e inhibe los transportadores de glutamato en los astrocitos. Los agentes oxidantes y peróxidos lipídicos inhiben la entrada de glutamato en los astrocitos por la oxidación de grupos sulfhidrilo en la proteína transportadora **(Barbeito y cols, 2004)**.

### 2.1.2.7. Estrés oxidativo

El sistema nervioso central (SNC) es susceptible al daño celular debido a la producción de EROS y del nitrógeno, dañando proteínas, ADN y lípidos **(Prida, 2009)**. Si existe una alta producción de EROS y hay poca capacidad antioxidante se produce estrés oxidativo y muerte celular. EROS como superóxido, hidroxilo o peroxinitrito pueden ocasionar citotoxicidad. Las células evitan esto mediante enzimas antioxidantes como SOD1, catalasa, glutatión reductasa, a través de las vitaminas C y E. El estrés oxidativo conduce a excitotoxicidad por glutamato y viceversa, se modifica el transportador de glutamato EAAT2, el aumento de Ca intracelular conlleva a la

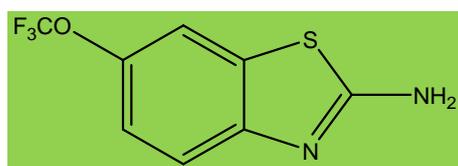
sobreproducción de EROS por las mitocondrias **(Esquerda, 2005)**. EROS producidas en la mitocondria pueden afectar la vía de transducción de señales mediante oxidación/reducción de residuos de cisteína en quinasas, fosfatasas, y otros factores regulatorios conduciendo a diferentes respuestas celulares **(Miquel y cols, 2012)**.

### 2.1.3. Farmacoterapia

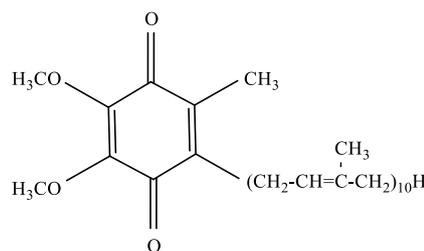
Han sido pocos los estudios preclínicos que han tenido éxito en extender la vida de ratones con ELA, varias terapias exitosas en ensayos murinos fallaron en ensayos clínicos en humanos **(Venkova y cols, 2012)**. Muchos medicamentos pueden reducir los síntomas, algunos tratamientos mejoran la calidad de vida y unos pocos parecen extender la vida **(Gordon, 2013)**. El tratamiento con el fármaco riluzol (Rilutek®) (figura 2.3.) aprobado por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA, por sus siglas en inglés) **(Fallas, 2010)**, enlentece la progresión de la enfermedad por aproximadamente dos meses **(Gordon, 2013)**. Es un fármaco neuroprotector que bloquea la neurotransmisión glutamatérgica en el SNC al inhibir la liberación de glutamato **(Lee y cols, 2013)**. Consiste en un derivado benzotiazol que atraviesa la barrera hematoencefálica. Previene la degeneración neuronal producida por componentes citotóxicos y protege a las neuronas del daño anóxico y de la toxicidad producida por el incremento de glutamato en el medio extracelular **(Borrás y cols, 1998)**, enlentece modestamente la declinación en la fuerza muscular y su eficacia ha sido atribuida como evidencia en apoyo a la teoría de la excitotoxicidad por glutamato **(Rowland y Shneider, 2001)**. Otros agentes terapéuticos que se han ensayado consisten en la utilización de ARN silenciador, degradación intranuclear del ARNm de SOD1 mutada en las MNs, microglía y astrocitos **(Boillée y cols, 2006)**, antagonistas de glutamato, agentes inmunomoduladores, agentes antivirales **(Rowland y Shneider, 2001)**, terapia génica, ARN de interferencia (ARNi) para disminuir o eliminar la expresión de un gen específico, vectores virales para la expresión de factores neurotróficos **(Prida, 2009)**. Los betacarotenos, el ácido lipoico, las vitaminas C y E, la coenzima Q10 (figura 2.3) demostraron que pueden retrasar la progresión de la

enfermedad **(Fallas, 2010)**. La administración de agentes antioxidantes como el tempol ha probado ser beneficiosa retrasando el inicio de la enfermedad, prolongando la supervivencia o ambas **(Prida, 2009; Linares y cols, 2013)**. La terapia con células madre se utiliza para reemplazar células que han degenerado, como sostén de las neuronas y de otras células mediante la liberación de factores neurotróficos **(Gordon, 2013)**. La exposición al metal pesado plomo puede retardar la progresión de la enfermedad al disminuir la toxicidad de los astrocitos reactivos induciendo el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). El VEGF liberado por los astrocitos puede reducir la neuroinflamación, con actividades citoprotectora y trófica para las MNs. EL Pb puede disminuir la actividad de SOD1 mutada y estimula la expresión de una enzima antioxidante en los astrocitos **(Barbeito y cols, 2010)**. La utilización de agentes anti-neuroinflamatorios (ej., polifenoles, ácido nordihidroguayarático-inhibidor de la enzima 5-lipooxigenasa) ha sido empleada para contrarrestar las acciones de moléculas inflamatorias. Un estudio realizado en modelo murino con un agente estabilizador de microtúbulos (noscapina) mejoró el transporte axonal y redujo la muerte de las MNs **(Venkova y cols, 2012)**. Los quelantes de Cu (antibióticos betalactámicos, penicilamina y *N*-acetilcisteína) han sido propuestos como enfoques terapéuticos, son capaces de retrasar el inicio de la enfermedad mejorando el rendimiento motor y enlenteciendo la progresión de la enfermedad en modelos animales **(Trojsi y cols, 2013)**. El colorante catiónico azul de metileno es un inhibidor de las enzimas monoaminoxidasa, sintasa del óxido nítrico en MNs y astrocitos reactivos, mejora la función mitocondrial reduciendo las EROS, posee efecto neuroprotector en varias enfermedades neurológicas; sin embargo, carece de eficacia en animales de experimentación **(Audet y cols, 2012)**. El factor de transcripción 2 relacionado con el factor nuclear eritroide 2 (Nrf2, por sus siglas en inglés) regula los genes que contienen el elemento de respuesta antioxidante (ARE, por sus siglas en inglés) que codifican enzimas antioxidantes y detoxificantes de fase II. El Nrf2 regula la síntesis de GSH liberado por los astrocitos al medio extracelular el cual reduce las consecuencias dañinas del óxido nítrico en las MNs. El compuesto *t*-butilhidroquinona activa Nrf2 y regula las enzimas que participan en la

síntesis de GSH previniendo el daño a las MNs (**Vargas y cols, 2006**). El agente quimiopreventivo sulforafano, un isotiocianato extraído de las crucíferas (brócoli, repollo), induce el factor Nrf2 conduciendo a la expresión de las enzimas antioxidantes de fase II e inhibe las citoquinas proinflamatorias (**Lin y cols, 2008**). El compuesto olesoxime, análogo de colesterol, es un neuroprotector, previene la liberación de factores apoptóticos y constituye un potencial tratamiento para la ELA (**Martin, 2010**).



Riluzol



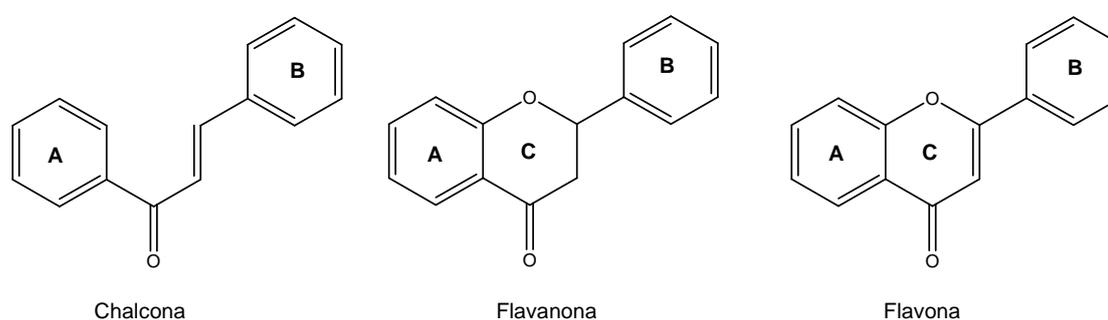
Coenzima Q10

**Figura 2.3. Estructuras químicas del fármaco utilizado para el tratamiento de ELA (resaltado en color verde claro), y de un agente en estudio (Rowland y Shneider, 2001).**

## 2.2. Flavonoides

Los flavonoides son metabolitos secundarios de bajo peso molecular, presentes en frutas, vegetales, aceite de oliva, té, vino tinto. Su esqueleto molecular básico consiste en dos anillos de carbono aromáticos unidos constituyendo anillos de benzopirano (A y C), y un anillo benceno (B) (**Resende y cols, 2012; Cabrera y cols, 2007; García y cols, 1993; Czczot y cols, 1990**). Se clasifican según el grado de oxidación del anillo C, el patrón de hidroxilación de la estructura del anillo y el sustituyente en posición 3, en chalconas, flavonas, flavanoles, isoflavonas, flavanonas, antocianinas, flavanonoles e isoflavonoides (Figura 2.4) (**Resende y cols, 2012; Ren y cols, 2003**). Presentan diferentes actividades biológicas: ansiolítica, antiinflamatoria, antiviral, antiprotozoaria, antimitótica, antioxidante (eliminan radicales libres donando átomos de hidrógeno), antibacterial, antialérgica, proapoptótica, quelantes de metales, antiproliferativa, inhibición

de enzimas (quinasa dependiente de ciclina, tirosina quinasa, aromatasas, topoisomerasa, proteína quinasa C), anticancerígena, inhiben el crecimiento celular, inducen apoptosis en células cancerígenas, tratamiento de dolores reumáticos, modulación de enzimas, disminuyen las EROS, inducen la transcripción nuclear del factor kappa B (NF- $\kappa$ B), inhiben la angiogénesis y la exportación de fármacos por la glicoproteína-P, interactúan con enzimas metabolizadoras de fase I (CYP) inhibiendo sus actividades y protegiendo a las células, inducen las enzimas metabolizadoras de fase II (**Engida y cols, 2013; Resende y cols, 2012; Cabrera y cols, 2007; Ren y cols, 2003**).



**Figura 2.4. Estructuras básicas de los tres grupos de flavonoides más característicos.**

### 2.2.1. Chalconas

Las chalconas sintéticas (Figura 2.4) se obtienen por condensación de Claisen-Schmidt catalizada por una base a partir de un aldehído y una cetona en un disolvente polar como metanol (**Hijova, 2006**). La estructura básica incluye dos anillos aromáticos unidos por un sistema carbonilo  $\alpha,\beta$ -insaturado de tres carbonos (**Venkatachalam y cols, 2012; Kumar y cols, 2003**), derivan de la estructura 1,3-difenilpropenona. Algunas de las actividades biológicas incluyen inhibición del ensamblaje de tubulina, inhiben la angiogénesis, inhibición de quinazas, modulación de proteínas involucradas en la resistencia a fármacos, inducción de la muerte celular (**Champelovier y cols, 2013**), actividad antioxidante, actividades antimutagénicas y/o anticancerígenas, antiinflamatorias (**Hijova, 2006; Cabrera y cols, 2007**), quimiopreventivas para el cáncer (**Cabrera y cols, 2010**).

### 2.3. Metabolismo y enzimas metabolizadoras

Cuando un fármaco penetra en el organismo, se absorbe, distribuye, metaboliza (biotransforma) y se excreta **(Buxton, 2007)**. El metabolismo o biotransformación es el conjunto de reacciones químicas catalizadas por sistemas enzimáticos. El hígado es el órgano donde ocurre la biotransformación de la mayor parte de los tóxicos **(Korc y Fogel, 2000)**. Los productos xenobióticos (fármacos, productos ambientales, contaminantes, agentes cancerígenos, alimentos) ingresan en el organismo y son transformados, parcial o totalmente, en metabolitos hidrosolubles por enzimas metabolizadoras. Las enzimas metabolizadoras se localizan en el hígado, riñones, pulmones, intestinos, glándulas suprarrenales y en la luz intestinal. Los fármacos pueden excretarse sin ser transformados o se pueden generar metabolitos inactivos, activos o tóxicos **(del Arco y Flórez, 2008)**. Los metabolitos electrófilos tóxicos, potenciales generadores de cáncer, son inestables y reaccionan con macromoléculas (ADN, ARN, proteínas) dañando a las células **(González y Tukey, 2007)**. Los metabolitos hidrosolubles y polares son eliminados del organismo por excreción a través de la orina y de la bilis, finalizando su actividad biológica **(Flórez, 2008; Buxton, 2007)**. Si un fármaco se metaboliza con rapidez, pierde su eficacia terapéutica, si se metaboliza con lentitud, se acumula en la circulación y la eliminación plasmática del fármaco disminuye **(González y Tukey, 2007)**. Las biotransformaciones en las células ocurren en el retículo endoplásmico liso (REL), citosol, mitocondrias, cubierta nuclear y membrana plasmática **(Buxton, 2007)**. En la Tabla 2.1. se muestra la ubicación subcelular de las enzimas metabolizadoras hepáticas.

**Tabla 2.1.** Enzimas metabolizadoras hepáticas y las fracciones subcelulares en las que se encuentran **(Kerns y Di 2008, a)**.

<b>Enzima metabolizadora</b>	<b>Fracción subcelular</b>
Citocromo P450	Microsomas/citosol/S9
Alcohol deshidrogenasa	Citosol/S9
Aldehído deshidrogenasa	Citosol
Diamino oxidasa	Citosol
Flavin-monooxigenasas	Microsomas/S9
Reductasas	Microsomas/citosol/S9
Esterasas	Microsomas/citosol/S9
UDP-Glucuronosiltransferasas	Microsomas/S9
Sulfotransferasa	Citosol/S9
N-Acetiltransferasa	Citosol/S9
Glutación-S-transferasas	Microsomas/citosol/S9
Metiltransferasas	Microsomas/citosol/S9
Conjugadoras de aminoácidos	Microsomas/S9

Las enzimas metabólicas de fase I o de funcionalización se ubican en el REL, modifican la estructura molecular del compuesto mediante oxidación, dealquilación, reducción, hidroxilación, exponen el grupo funcional del compuesto, se pierde, retiene o intensifica la actividad farmacológica. Las enzimas de fase II o biosintéticas se encuentran en el citosol y en el REL, añaden grupos polares a la molécula, establecen un enlace covalente entre un grupo funcional del compuesto, o metabolito de fase I, con derivados endógenos (ácido glucurónico, sulfato, glutatión, aminoácidos o acetato), formando conjugados polares que son inactivos y se excretan por la orina y heces (**Kerns y Di 2008, b; Kerns y Di 2008, c; Buxton, 2007**). Las enzimas metabolizadoras de fase II detoxificantes incluyen la aldehído reductasa, glutatión reductasa, epóxido hidrolasa, glutatión-S-transferasa (GST), quinona reductasa, y UDP-glucuronosiltransferasa. Estas pueden competir con enzimas activadoras para eliminar electrófilos reactivos vía conjugación (**Jiang y cols, 2003**). Existen compuestos que actúan induciendo la activación de estas enzimas y así modificando la capacidad metabolizadora de xenobióticos. Estos pueden ser clasificados en inductores monofuncionales que aumentan las enzimas de fase II y activan el ARE mediante el sistema Keap1-Nrf2, en inductores bifuncionales que aumentan las enzimas de fase I y de fase II, se unen con alta afinidad al receptor aril hidrocarbónico y al ARE (**Cabrera y cols,**

**2010).** Los agentes inductores de glutatión transferasas promueven la actividad de ARE en el gen que codifica la enzima. El ligando xenobiótico se une a la proteína citoplásmica Nrf2 asociada a la proteína Keap1. El ligando provoca la disociación de ambas proteínas y el complejo xenobiótico-Nrf2 ingresa al núcleo y actúa sobre el elemento de respuesta ARE **(del Arco y Flórez, 2008)**.

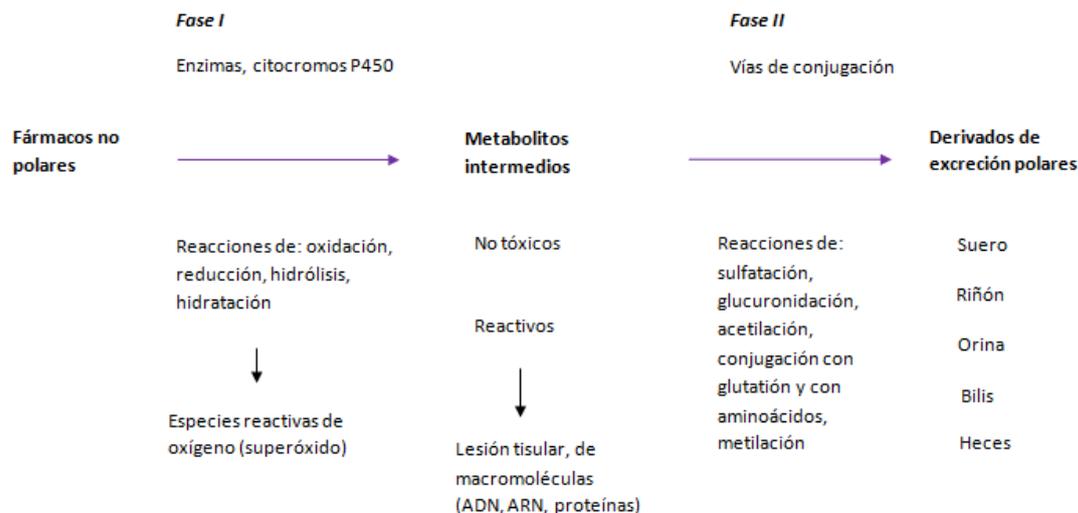
Enzimas metabolizadoras de fase I: realizan reacciones de oxidación, reducción e hidroxilación, alteran o crean nuevos grupos funcionales, rompen enlaces ésteres y amidas liberando nuevos grupos funcionales **(del Arco y Flórez, 2008; González y Tukey, 2007)**. En la fase I se introducen grupos funcionales (-OH, -NH<sub>2</sub>, -COOH, -SH) que permiten las reacciones de conjugación posteriores formándose moléculas polares inactivas, activas, tóxicas, con la misma o diferente actividad que la del compuesto original **(del Arco y Flórez, 2008)**. Las enzimas que se encargan de las reacciones de oxidación son las de la familia del citocromo P450 (CYP 450, por sus siglas en inglés), monooxigenasas con flavina (FMO, por sus siglas en inglés) e hidrolasas de epóxido (EH, por sus siglas en inglés) **(González y Tukey, 2007)**.

Las reacciones de fase I o de funcionalización incluyen: oxidaciones microsómica y alifática, hidroxilación aromática, *N*-desalquilación, *O*-desalquilación, *S*-desalquilación, epoxidación, desaminación oxidativa, formación de sulfóxidos, desulfuración, *N*-oxidación y *N*-hidroxilación, oxidación extramicrosomal, oxidaciones de alcoholes y aldehídos, de purinas, desaminación oxidativa (monoaminooxidasa y diaminooxidasa), reducción, azorreducción y nitrorreducción, hidrólisis de ésteres y amidas, de enlaces peptídicos, hidratación de epóxidos **(del Arco y Flórez, 2008)**.

Enzimas metabolizadoras de fase II: forman un conjugado del compuesto o metabolito de fase I (con átomos de oxígeno, nitrógeno o azufre) con moléculas endógenas (ácido glucurónico, acetilo, ácido sulfúrico, glutatión, sulfato) de mayor peso molecular, este proceso inactiva y elimina del organismo los compuestos y metabolitos electrófilos producidos por oxidación **(Cabrera y cols, 2010; del Arco y Flórez, 2008; González y Tukey, 2007)**. En las

reacciones de fase II el compuesto conjugado puede ser activo o tóxico **(del Arco y Flórez, 2008)**. Las enzimas de fase II comprenden superfamilias de enzimas conjugadoras como glutatión-S-transferasa (GST, por sus siglas en inglés), UDP-glucuronosiltransferasa (UGT, por sus siglas en inglés), sulfotransferasa (SULT, por sus siglas en inglés), *N*-acetiltransferasa (NAT, por sus siglas en inglés) y metiltransferasa (MT, por sus siglas en inglés), NAD(P)H:quinona reductasa (QR, por sus siglas en inglés) **(Cabrera y cols, 2010; González y Tukey, 2007)**. El hígado es el órgano con mayor expresión de enzimas CYP450 y con mayor capacidad biotransformadora **(Donato y O'Connor, 2012)**. Las CYP450 son enzimas activadoras que pueden transformar los xenobióticos en compuestos electrofílicos y reactivos, y en mutagénicos y cancerígenos **(Jiang y cols, 2003)**. Se localizan en el RE y en las mitocondrias **(del Arco y Flórez, 2008)**. La enzima oxidorreductora NADPH-CYP transfiere electrones a la CYP450 y en presencia de O<sub>2</sub> oxida sustratos hidrófobos. Las reacciones que realizan las CYP450 en mamíferos son: *N*-desalquilación, *O*-desalquilación, *S*-desalquilación, hidroxilación aromática, *N*-oxidación, *S*-oxidación, desaminación y deshalogenación **(González y Tukey, 2007)**. GST microsomal es una enzima detoxificante asociada a las membranas del RE y mitocondrias, se expresa mayormente en el hígado **(Shi y cols, 2012)**. Las GST (citosólica, mitocondrial y microsomal) detoxifican y biotransforman xenobióticos, catalizan la conjugación de GSH con compuestos electrofílicos con átomos de carbono, nitrógeno o azufre, protegiendo a las macromoléculas biológicas (proteínas y los ácidos nucleicos) **(Hayes y cols, 2005)**.

Las reacciones de fase II o de conjugación incluyen: glucuronidación, acetilación, conjugación con glutatión, conjugación con sulfato, *N*, *O* y *S*-metilación, transulfuración **(del Arco y Flórez, 2008)**.



**Figura 2.5. Esquema de las reacciones metabólicas de fase I y II.** Adaptado de **del Arco y Flórez, 2008**.

### 2.3.1. Metabolismo de tioles

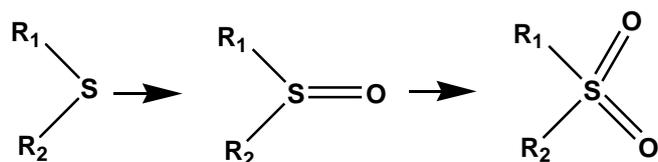
Las reacciones metabólicas de los tioles incluyen desulfuración, S-metilación, la formación de disulfuro mediante oxidación (**Zaragoza, 2012 a**). Los tioles son considerados como compuestos tóxicos, las S-metiltransferasas de tioles detoxifican estos compuestos. Muchos compuestos sulfhidrilo exógenos son S-metilados, esta reacción permite la detoxificación de los tioles (**Williams, 2008**).

El grupo tioéter no produce metabolitos tóxicos, las reacciones metabólicas de los tioéteres incluyen la dealquilación, la oxidación a sulfóxidos (proceso reversible) y a sulfonas. Los sulfóxidos pueden sufrir oxidación produciendo sulfonas. La S-oxidación puede generar intermedios electrofílicos que causan toxicidad o una respuesta inmune por alquilación de proteínas (**Zaragoza, 2012 b**).

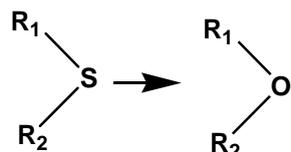
En las reacciones oxidativas de fase I, desalquilación oxidativa de grupos alquilo asociados a N, O y S, se eliminan radicales alquilo convirtiéndose en sus respectivos aldehídos:



En la formación de sulfóxido se introducen oxígenos en un tioéter:



En la desulfuración se sustituye el azufre por oxígeno:

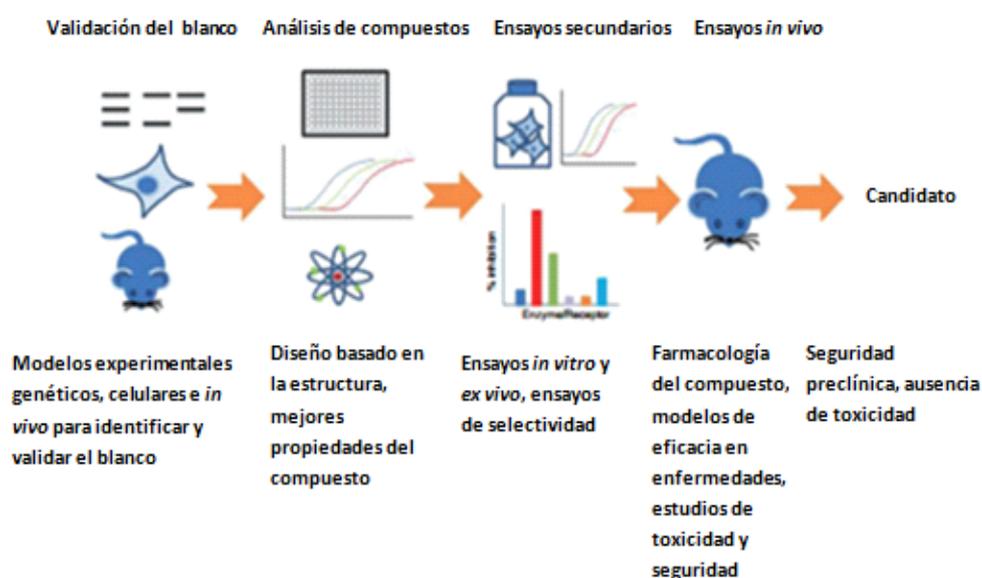


## 2.4. Descubrimiento de un fármaco

Un programa de descubrimiento de fármacos se inicia debido a una enfermedad o condición clínica sin fármacos disponibles que sean eficaces. La investigación inicial genera datos para desarrollar una hipótesis de la inhibición o activación de una proteína o vía que resultará en un efecto terapéutico para un individuo con determinada enfermedad. Durante el descubrimiento, la investigación asegura encontrar una molécula, que progresará hacia los estudios de desarrollo preclínico, y si es exitosa, hacia estudios de desarrollo clínico y finalmente será un fármaco de mercado (figura 2.6) **(Hughes y cols, 2011)**. Los fármacos pueden extraerse a partir de fuentes naturales, como plantas o microorganismos, o pueden sintetizarse. Estos últimos se obtienen a partir de la química medicinal que está involucrada en su diseño y síntesis, basados en el conocimiento y entendimiento de como interactúan con dianas biológicas (proteínas, enzimas, receptores, canales iónicos, proteínas transportadoras) **(Stocks, 2013)**. Luego de esta etapa empleando modelos animales vivos, tejidos o cultivos celulares se hace un cribado de las nuevas moléculas para evaluar su eficacia. Aquellas moléculas que presentan actividad destacada se pasan a un desarrollo preclínico donde se realizan estudios para definir el mecanismo de acción y posibles efectos terapéuticos, las características farmacocinéticas y la toxicidad del potencial fármaco. Posteriormente a esta etapa si el compuesto la supera se pasa al desarrollo clínico. Éste se inicia cuando los estudios preclínicos demuestran

que el nuevo fármaco tiene efectos farmacológicos iguales o más eficaces que otros fármacos existentes para una determinada patología (**Armijo, 2008**). Los ensayos clínicos constan de varias etapas: de fase I prueban características farmacéuticas y de seguridad clínica, la toxicidad de los fármacos, los de fase II investigan el régimen de dosis, seguridad y toxicidad, viabilidad, eficacia, los de fase III constituyen la prueba final de eficacia y seguridad. En los estudios de fase IV se detectan efectos secundarios graves que pueden escapar a la detección en estudios de fase temprana (**Gordon, 2013**).

La Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (O.E.C.D. de sus siglas en inglés) es un organismo internacional que establece recomendaciones sobre la realización de los ensayos toxicológicos, los estudios preclínicos de seguridad, la evaluación de sustancias químicas aceptados. Incluyen información sobre el sistema experimental y sus condiciones de mantenimiento, las pautas de aplicación del compuesto de ensayo, los niveles de dosis y parámetros de evaluación (**de Miguel y cols, 2012; Gil y López de Cerain, 2012**).



**Figura 2.6. Esquema del proceso de descubrimiento de un fármaco en sus etapas iniciales.** Adaptado de **Hughes y cols, 2011**.

### 2.5. Estudios preclínicos

Durante la investigación y desarrollo de fármacos se realizan estudios preclínicos los cuales incluyen: determinación del perfil metabólico *in vitro* utilizando microsomas o fracción S9 de hígado de distintas especies, estudios de absorción, evaluación del pasaje de la barrera hematoencefálica, alteración de la dermis, estudios de inhibición o inducción de las enzimas de la familia CYP, estabilidad *in vitro* en plasma y suero de distintas especies, unión a proteínas plasmáticas, farmacocinética y toxicocinética, tolerancia local, entre otros **(Gil y López de Cerain, 2012)**. Se investigan los requisitos de eficacia terapéutica y seguridad exigidos por las autoridades sanitarias para su comercialización y administración al ser humano. Las etapas iniciales del desarrollo de nuevos fármacos incluyen ensayos *in vitro* como modelos simplificados del organismo humano, estudios de la actividad farmacológica, el perfil metabólico (velocidad y grado de metabolización, rutas metabólicas y enzimas implicadas), estudio de las interacciones metabólicas del fármaco con otras moléculas **(Donato y O'Connor, 2012)**, relaciones estructura-actividad mediante cristalografía de rayos X, estudios de resonancia magnética nuclear (RMN), modelaje computacional, propiedades de absorción, distribución, metabolismo, excreción, y toxicidad (ADME/Tox), lipofilicidad, peso molecular, solubilidad, permeabilidad, estabilidad química, unión a tejidos y proteínas, farmacocinética, vida media, biodisponibilidad, dosis letal **(Kerns y Di, d)**. Se realizan estudios de genotoxicidad para la detección de agentes mutagénicos que producen mutaciones en el ADN, ensayo de micronúcleos *in vivo* para determinar el daño cromosómico, evaluación del efecto en el desarrollo embrionario **(Gámez y Más, 2007)**.

#### 2.5.1. Estudios de metabolismo *in vitro*

Modelos *in vitro* de origen hepático incluyen sistemas subcelulares y fracciones celulares. Los microsomas consisten en un sistema subcelular procedente de las membranas del REL a las que se encuentran unidos las CYP y enzimas conjugadoras, tienen gran capacidad metabólica y carecen de enzimas citosólicas **(Donato y O'Connor, 2012)**. Se puede estudiar el

metabolismo del fármaco independientemente de factores individuales (edad, sexo, raza, factores dietéticos, ambientales, patológicos, hormonales) que pudieran influir en la capacidad metabólica. Este modelo subcelular ofrece una reproducción parcial del metabolismo de fármacos que tiene lugar en el hígado. Para el ensayo con microsomas, además del sustrato, es necesario aportar NADPH o un sistema regenerador del mismo para asegurar una concentración suficiente durante la reacción. El sistema de regeneración de NADPH está basado en la reacción catalizada por la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (**Donato y O'Connor, 2012**).

### 2.6. Estudio de mutagenicidad mediante ensayo de Ames

#### 2.6.1 Ensayo de toxicidad en bacterias *Salmonella typhimurium*

El ensayo de toxicidad se realiza para establecer la dosis máxima a ser empleada en el ensayo de Ames. Las bacterias crecen en presencia de cinco concentraciones del compuesto comenzando con una concentración máxima dada, si la solubilidad lo permite, de lo contrario se utiliza una dosis más baja. Después de determinar la concentración máxima no tóxica para cada compuesto se realiza el ensayo de Ames (**Gabay y cols, 2014**).

#### 2.6.2. Ensayo de Ames

Los estudios de mutagenicidad son una parte esencial en la evaluación toxicológica de cualquier producto químico tanto de síntesis como natural (**Fernández y cols, 2006**). Los mutagénos, químicos o físicos, interactúan con el ácido desoxirribonucleico (ADN) provocando cambios en su estructura como deleciones, adiciones o reemplazo de bases (**Trossero y cols, 2006**). Bruce Ames y sus colegas de la Universidad de California en Berkeley, en la década de 1970, desarrollaron el ensayo de Ames para la detección de compuestos mutagénicos (**Brock, 2009; Ames, 1973**). El ensayo de Ames emplea cepas bacterianas auxótrofas para histidina, capaces de detectar compuestos mutagénicos que provoquen cáncer (**Sandoval, 2008; Trossero y cols, 2006; Mortelmans y Zeiger, 2000**). El ensayo *in vitro* consiste en la utilización de cinco cepas de la bacteria *Salmonella enterobacter typhimurium* (*S. typhimurium*) que se seleccionan entre TA97, TA97a, TA98, TA100, TA1535,

TA1537, TA1538, TA102, TA104 (OECD, 1997). Estas cepas presentan una mutación en el operón de histidina (His-) y no pueden sintetizar una enzima de la vía de síntesis de His dependiendo de dicho aminoácido en el medio de cultivo para su crecimiento. Las cepas tienen mutaciones que aumentan la capacidad de reconocer diferentes compuestos mutagénicos. La mutación rfa altera la pared del lipopolisacárido aumentando la permeabilidad a moléculas de gran tamaño, la mutación *uvrB* causa alteración en el sistema de reparación del ADN de la bacteria. Presentan plásmidos con resistencia a antibióticos, el plásmido pKM101 presente en las cepas TA97, TA98, TA100 y TA102, aumenta la mutagénesis química, promueve un sistema de reparación del ADN propenso a error y confiere resistencia a ampicilina; el plásmido pAQ1 en las cepas TA102 y TA104 confiere resistencia a tetraciclina (**Gabay y col., 2014**). La introducción de plásmidos potencia la mutagénesis inducida por la luz ultravioleta (UV) y por compuestos químicos al aumentar la vía de reparación del ADN por recombinación propensa a error (**Mortelmans y Zeiger, 2000**). Las placas de AMG son suplementadas con histidina y biotina. La cepa TA102 posee un adecuado sistema de reparación por escisión del ADN, no requiere biotina (las demás cepas la requieren) debido a la delección del gen *bio*. Los mutantes *uvrB* son sensibles a la luz UV (**Maron y Ames, 1983**). Se forman colonias con las células prototróficas a histidina (His-), procedentes de mutaciones espontáneas u originadas de mutaciones provocadas por el compuesto. La delección del gen *uvrB* se extendió hasta el gen de biotina y las cepas son auxotróficas para biotina (bio-) (**Sandoval, 2008**). En la Tabla 2.2 se muestran los genotipos que presentan las diferentes cepas.

**Tabla 2.2.** Genotipos de las cepas de *S. typhimurium* utilizadas en el ensayo de Ames.

Cepa	Mutación en el operón de histidina			LPS	Genes <i>uvrB</i> del sistema de reparación del ADN y <i>bio</i>	Plásmido <i>pKM101</i>
	hisD3052	hisG46	hisG428 ( <i>pAQ1</i> )			
TA98	Presente			Rfa	Deletado	Presente
TA100		Presente		Rfa	Deletado	Presente
TA102			Presente	Rfa	Tipo salvaje	Presente
TA1535		Presente		Rfa	Deletado	Ausente
TA1537						Ausente

Modificado de **Maron y Ames 1983**.

Los compuestos pueden ocasionar mutaciones en o cerca de las mutaciones preexistentes permitiendo la reversión al estado tipo salvaje, esto hace que las bacterias sinteticen His reconstituyendo la función génica original y se forman colonias en ausencia de His en el medio de cultivo (**Mortelmans y Zeiger, 2000**). Las cepas bacterianas se hacen crecer en presencia de un compuesto a evaluar, a diferentes concentraciones. Las colonias bacterianas que revierten espontáneamente no requieren His. Crecen sobre un césped bacteriano formado por bacterias auxótrofas. El número de colonias revertientes espontáneas varía dependiendo de la cepa, del ensayo, de la concentración de His en el agar, de la contaminación por otros microorganismos (ej., hongos) (**Maron y Ames, 1983**).

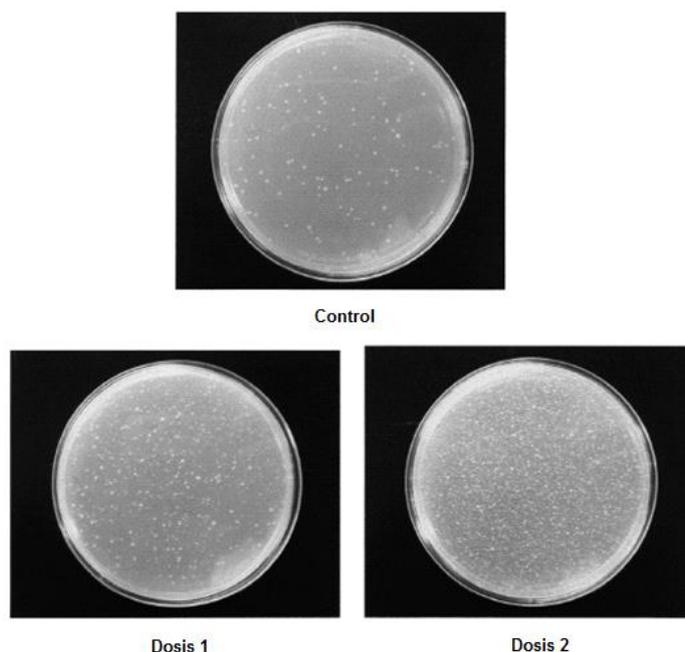
Las cepas pueden revertir a su fenotipo original de manera espontánea o por acción de mutágenos. Las bacterias se siembran en un medio con baja concentración de His, aquellas bacterias que mutan a His<sup>+</sup> forman colonias visibles. Los mutágenos aumentan la tasa de retromutación (reversión) en las cepas auxótrofas. Si la tasa de reversión se ha incrementado por la presencia de un mutágeno, el número de colonias revertientes aumenta. Algunos compuestos son mutagénicos al ser modificados en el hígado por enzimas metabolizadoras que los convierten en sustancias activas. Dado que las bacterias no presentan enzimas metabolizadoras de xenobióticos se utiliza un sistema exógeno de activación metabólica como la fracción S9 obtenida de hígado de rata (**Gil y López de Cerain, 2012**).

Posibles resultados:

Compuesto mutagénico: el número de colonias revertientes duplica el número de colonias del control negativo en dos concentraciones, se observa un aumento dosis-dependiente, al aumentar la dosis del compuesto aumenta el número de colonias.

Compuesto no mutagénico: el número de colonias revertientes no duplica el número de colonias del control negativo, además no se observa un aumento del número de colonias revertientes al aumentar la dosis del compuesto (**Mortelmans y Zeiger, 2000**).

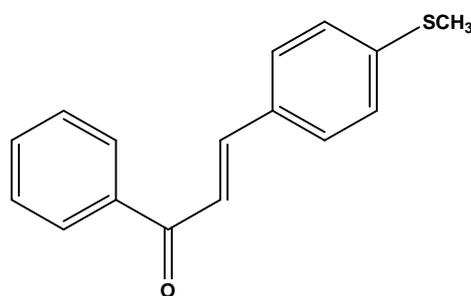
En la Figura 2.7. se muestran los resultados de un ensayo de Ames, en la placa control se observa el crecimiento de las colonias revertientes espontáneas, en las otras dos placas se añadió un compuesto mutagénico a una concentración más baja (dosis 1) y a una concentración más alta (dosis 2). La placa cuya concentración del compuesto es más elevada, presenta un mayor número de colonias que revirtieron al fenotipo tipo salvaje por acción del compuesto mutagénico.



**Figura 2.6. Ensayo de Ames con la cepa TA100 y azida de sodio como compuesto mutagénico.** Placas control: colonias revertientes espontáneas, dosis 1: 2.5 µg/placa, dosis 2: 5 µg/placa. Extraído de **Mortelmans y Zeiger, 2000**.

### 3. ANTECEDENTES

Los antecedentes a este trabajo, en relación a la patología de ELA, fueron generados por el grupo liderado por el Dr. Barbeito (**Barbeito y cols, 2011; Díaz-Amarilla y cols, 2011; Vargas y cols, 2006; Díaz-Amarilla, en curso**). Se diseñaron estudios involucrando compuestos de la quimioteca del Grupo de Química Medicinal con capacidad activadora de Nrf2. Se seleccionaron derivados sintéticos de flavonoides -chalconas, flavonas y flavanonas- (ver Figura 2.4 sección Introducción) activadores de Nrf2 (**Cabrera, 2012; Cabrera y cols, 2010; Cabrera y cols, 2007**). Se realizó un cribado en la búsqueda de citotoxicidad diferencial *in vitro* sobre cultivos primarios en monocapa, con las líneas celulares de: astrocitos neonatales no transgénicos (wt) y transgénicos (SOD1G93A) o AbA. Se evaluó la sobrevivencia celular después de 24 h de tratamiento mediante la técnica de tinción con Sulforodamina B. Se realizaron estudios dosis-respuesta *in vitro* para los productos más relevantes. De los estudios sobre monocapas celulares y con bajos niveles de factores de crecimiento se demostró que dos de los diez compuestos ensayados fueron capaces de inducir la muerte selectiva de las células AbA. Destacándose un derivado de chalcona conteniendo en el anillo B un agrupamiento tiometilo, denominado CH38 (figura 3.1). Con la chalcona CH38 se han realizado estudios *in vivo* donde se ha analizado la sobrevivencia de animales con ELA tratados con la chalcona (**Díaz-Amarilla, en curso**). Los resultados han sido prometedores, con significativa sobrevivencia de los animales.



**Figura 3.1. Estructura de la chalcona CH38 con actividad *in vitro* e *in vivo* en ELA.**

## 4. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

### 4.1. Hipótesis

La chalcona CH38 propuesto como potencial fármaco para el tratamiento de la ELA es estable metabólicamente y no es mutagénico.

### 4.2. Objetivo general

Estudios preclínicos *in vitro* de un potencial fármaco y de sus principales metabolitos, para el tratamiento de ELA.

### 4.3. Objetivos específicos

- Estudio metabólico *in vitro* del potencial fármaco utilizando fracciones microsomal y citosólica de hígado de rata, a diferentes tiempos de incubación.
- Ensayos de toxicidad en la cepa TA98 de *S. typhimurium*.
- Ensayo de mutagenicidad, mediante ensayo de Ames, del potencial fármaco y de sus principales metabolitos utilizando las cepas TA98, TA100, TA102, TA1535 y TA1537 de *S. typhimurium*.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1. Preparación de Chalcona CH38 y sus potenciales metabolitos

#### 5.1.1. Generalidades

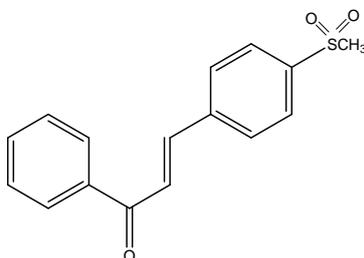
Los reactivos provienen de fuentes comerciales (Sigma-Aldrich, Janssen, Merck, Fluka, entre otros) y se utilizan sin purificar. El avance de las reacciones y la pureza de los productos se examinaron por CCF en placas de poliéster recubiertas con silicagel (SiO<sub>2</sub>) como fase sólida (AlugramR Sil G/UV254) con indicador fluorescente. La fase móvil consistió en una mezcla de EP:AcOEt (8:2) y CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH (99:1). Se compararon los productos obtenidos con los correspondientes patrones de la quimioteca de nuestro grupo. Los cromatogramas se revelaron por sus colores característicos (CH38, amarillo), exposición a luz UV (254 nm), exposición a vapores de yodo (I<sub>2</sub>) y asperjado con reactivo de Brady (2,4-dinitrofenilhidrazina disuelta en etanol y utilizando H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> como catalizador). Las determinaciones espectrofotométricas se realizaron en un espectrofotómetro Varian Cary 50 Tablet, y UV-visible Spectrophotometer, Shimadzu UV-1603, NanoDrop.

#### 5.1.2. (*E*)-3-4-(metiltio)fenil)-1-fenilprop-2-en-1-ona (CH38)

La chalcona CH38 se preparó siguiendo el procedimiento descrito por **Cabrera y cols, 2007**. Brevemente se preparó una solución conteniendo NaOH (0.832 g) en MeOH absoluto (10 mL), se adiciona acetofenona (1.0 g, en cloroformo 0.96 mL) y 4-(metiltio)carboxialdehído (1.266 g, en cloroformo 1.1 mL), finalmente se adicionan otros 10 mL de MeOH absoluto. La mezcla se mantiene con agitación vigorosa hasta disolución. La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante 12 h. Luego de este tiempo la mezcla se neutraliza con HCl (10%, v/v) se filtra a vacío y se lava con éter de petróleo. El sólido obtenido se recrystaliza de etanol. El sólido obtenido se compara por CCF con el patrón del producto.

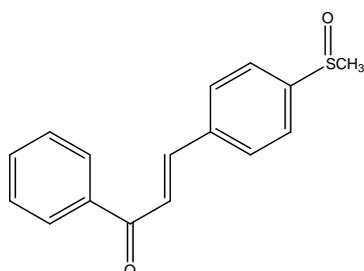
### 5.1.3. Potenciales metabolitos de CH38

#### 5.1.3.1. (E)-3-(4-metilsulfinil)fenil)-1-fenilprop-2-en-1-ona (S2)



La síntesis se realizó siguiendo el procedimiento puesto a punto en el Grupo de Química Medicinal. A una solución enfriada a 0°C de CH38 (0.1g, 0.4 mmoles) en cloroformo (0.8 mL) se adiciona una solución de ácido metacloroperbenzoico (mCPB) (0.08 g, 0.4 mmoles) en cloroformo (1.1 mL). La mezcla se agita a temperatura ambiente. El avance de la reacción se monitorea mediante CCF en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH (99:1) hasta no observar presencia de CH38. La mezcla se neutraliza con NaHCO<sub>3</sub>, se extrae con acetato de etilo (AcOEt) (3 x 10 mL), se seca con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Posteriormente, se filtra el agente secante y el líquido se evapora a presión reducida en evaporador rotatorio. El residuo se purifica por cromatografía en columna utilizando CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH (99:1) como fase móvil. El producto se comparó con un patrón del mismo.

#### 5.1.3.2. (E)-3-(4-metilsulfonyl)fenil)-1-fenilprop-2-en-1-ona (S1)



La síntesis se realizó siguiendo el procedimiento puesto a punto en el Grupo de Química Medicinal. A una solución enfriada a 0°C de CH38 (0.1g, 0.4 mmoles) en cloroformo (0.8 mL) se adiciona una solución de ácido metacloroperbenzoico (mCPB) (0.27 g, 1.6 mmoles) en cloroformo (1.1 mL). La mezcla se agita a temperatura ambiente. El avance de la reacción se monitorea mediante CCF en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH (99:1) hasta no observar presencia de CH38.

La mezcla se neutraliza con  $\text{NaHCO}_3$ , se extrae con acetato de etilo (AcOEt) (3 x 10 mL), se seca con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Posteriormente, se filtra el agente desecante y el líquido se evapora a presión reducida en evaporador rotatorio. El residuo se purifica por cromatografía en columna utilizando sílica gel como fase estacionaria y  $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$  (99:1) como fase móvil. El producto se comparó con un patrón del mismo.

### 5.2. Cuantificación de proteínas

La concentración de proteínas, para establecer la actividad enzimática de las fracciones microsomal y citosólica (obtenidas del Laboratorio de Química Orgánica), se determinó por el método del ácido bicinconínico (BCA). Se utilizó el método del BCA utilizando el *kit* comercial de Sigma según especificaciones del proveedor en formato de placa de 96 pocillos. A 25  $\mu\text{L}$  de muestra proteica se le adicionaron 200  $\mu\text{L}$  del reactivo de trabajo BCA (reactivo A/reactivo B 1:50). El reactivo A contiene BSA (albúmina sérica bovina),  $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ , tartrato de sodio en NaOH, pH 11.3, y el reactivo B contiene  $\text{CuSO}_{4.5}\text{H}_2\text{O}$  (4%, p/v). Se incubó la placa a 37°C durante 30 min y se midió la absorbancia a 562 nm en un lector de placas. La concentración de la muestra proteica se mantuvo entre 0.2 y 1.0 mg/mL. Se realizó una curva de calibración con BSA para cada ensayo utilizando un set de estándares de 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1 mg/mL de BSA.

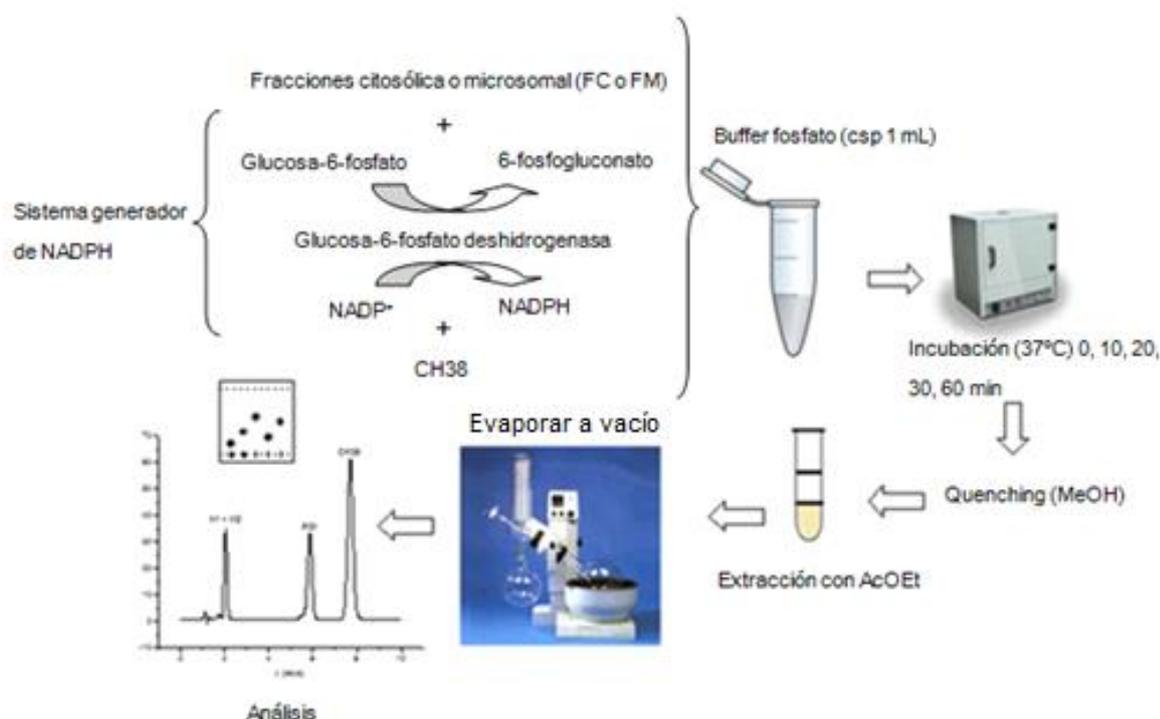
### 5.3. Determinación de la actividad glutatión-S-transferasa

La actividad enzimática de GST se determinó agregando el sustrato 1-cloro-2,4-dinitrobenzenu (CDNB) y GSH a la enzima, de forma de catalizar la conjugación de GSH a la molécula. La mezcla de reacción contenía amortiguador fosfato (100 mM, pH 6.5), CDNB (1 mM final) y GSH (1 mM final). Se preparó una solución stock de CDNB (200 mM) en etanol (95% v/v), tal que el volumen a agregar en el amortiguador de reacción sea de aproximadamente 125  $\mu\text{L}$ . Se inició la reacción con el agregado de 20  $\mu\text{L}$  de una dilución 1/20 de la muestra (fracción microsomal o citosólica). La reacción se realizó a 30°C siguiendo el aumento en la absorbancia a 340 nm ( $\epsilon_{340\text{nm}}=9.6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ), longitud de onda a la que absorbe el conjugado CDNB-

GSH, durante 1 min. Se realizó una corrección por actividad espontánea en ausencia de enzima. La unidad de actividad enzimática se define como la cantidad de enzima que cataliza la formación de 1  $\mu\text{mol}$  de S-2,4-dinitrofenol glutatión por min a 30°C usando 1 mM de GSH y CDNB. **(Cabrera y cols, 2010).**

### 5.4. Ensayo de metabolización *in vitro*

Se preparó una mezcla de incubación con 10  $\mu\text{L}$  de cada uno de los componentes de un sistema generador de NADPH (130 mM  $\text{MgCl}_2$ , 40mM  $\text{NADP}^+$ , 350 mM glucosa-6-fosfato, 50 U/mL glucosa-6-fosfato deshidrogenasa), 10  $\mu\text{L}$  del compuesto (40 mM) disuelto en DMSO (1 mL), fracciones citosólica (FC) o microsomal (FM) de hepatocitos de rata, y un volumen a determinar de amortiguador fosfato hasta un volumen total de 1 mL (0.1 M, 1.5 mM EDTA, pH 7.4). La concentración proteica en las fracciones microsomal y citosólica fue de 1 mg/mL. Se incluyeron dos controles negativos C(-), C(-)1 sin FM ni FC, y un C(-)2 sin CH38, se incubaron por 60 min. Las mezclas fueron incubadas a 0, 10, 20, 30 y 60 min, en placas de 24 pocillos a 37°C. La reacción se detuvo añadiendo metanol (MeOH, 400  $\mu\text{L}$ ), y la mezcla fue mantenida a 4°C para precipitación proteica. Los productos se aislaron mediante tres o más extracciones con acetato de etilo (EtOAc, 400  $\mu\text{L}$ ), y el disolvente orgánico fue evaporado a vacío. Se resuspendió en un volumen mínimo de acetona para el análisis por cromatografía en capa fina (CCF) de los productos formados. En la Figura 5.1 se detalla el procedimiento del ensayo de metabolización *in vitro*. **(Boiani y cols, 2009; Grosa y cols, 2004)**



**Figura 5.1. Representación esquemática del ensayo de metabolización *in vitro*.**

### 5.5. Análisis por cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC)

La cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC, por sus siglas en inglés) consiste en una herramienta de la química analítica que separa, identifica y cuantifica compuestos presentes en una mezcla de reacción **(Engida y cols, 2013)**. El metabolismo *in vitro* fue estudiado mediante HPLC. Se utilizó una columna C18 (4.6 x 100 mm) como fase estacionaria, la fase móvil consistió en una mezcla de H<sub>2</sub>O MiliQ y MeOH calidad HPLC (7:3, v/v). Las mezclas de reacción, los patrones de CH38 y de los metabolitos S1 y S2 fueron disueltos en MeOH (1 mL). Las muestras fueron filtradas con filtros de celulosa (0.2 μ). Se inyectaron (40 μL aproximadamente) de las muestras en el equipo de HPLC (Agilent Technologies 1260 Infinity, Alemania). Condiciones del cromatograma: flujo de 1 mLmin<sup>-1</sup>, tiempo de corrida de 10 min. La detección UV se realizó a las longitudes de onda de 258, 296, 304 y 348 nm.

### 5.6. Ensayo de toxicidad

En el ensayo de toxicidad, se determinó la mínima dosis tóxica (DTM) de la chalcona CH38 y de los metabolitos S1 y S2, utilizando la cepa TA98 de *S. typhimurium*. La mezcla consistió en PBS (500 µL), cultivo bacteriano (100 µL) y compuesto disuelto en DMSO (50 µL). Se realizaron cuatro diluciones seriadas al décimo a partir de una concentración máxima del compuesto. Las placas de agar fueron suplementadas con 100 mM de histidina y 0.5 mM de biotina. Se incubaron a 37°C por 24 h. Se incluyó un control de fenotipo para verificar que la cepa fuese la correcta. La DTM se seleccionó como la dosis máxima a ser utilizada en el ensayo de Ames. Las concentraciones variaron de 5000 a 0.5 µg/placa para los tres compuestos evaluados. **(Gabay y cols, 2014)**

### **5.7. Estudio de mutagenicidad mediante ensayo de Ames**

Se realizó el ensayo de Ames **(Mortelmans y Zeiger, 2000; Maron y Ames, 1983, OECD, 1997; Gabay y cols, 2014)** según el método de preincubación, con el objetivo de determinar si el potencial fármaco y sus principales metabolitos S1 y S2 eran mutagénicos o no. Se utilizaron las cepas TA98, TA100, TA102, TA1535 y TA1537 de *S. typhimurium* His-, obtenidas comercialmente de Molttox (NC/USA). Se preparó el cultivo bacteriano utilizando una colonia aislada obtenida de una placa máster correspondiente a una cepa dada, o por medio de un criotubo (banco de trabajo) en el caso de la cepa TA102 (se añadieron 100 µL de los antibióticos ampicilina y tetraciclina al medio de cultivo), y se inoculó el medio de cultivo Oxoid N°2 (30 mL) (Wesel, Germany), se incubó a 37°C durante 12 h (concentración de  $2 \times 10^9$  bacterias/mL). Cumplido este tiempo, se determinó el crecimiento bacteriano observando la turbidez. Se realizó el ensayo en dos condiciones: en ausencia de activación metabólica (0% fracción S9) cuya mezcla de reacción contenía el compuesto disuelto en DMSO (50 µL), amortiguador fosfato (500 µL) (0.1 M, pH 7.4) y cultivo bacteriano (100 µL). En presencia de activación metabólica (5% fracción S9, obtenida de Molttox, NC/USA) la mezcla de reacción contenía mezcla S9 (500 µL) (ver componentes en la sección Anexo), compuesto disuelto en DMSO (50 µL) y cultivo bacteriano (100 µL). Se emplearon cinco concentraciones del compuesto comenzando con

la DTM determinada en el ensayo de toxicidad y realizando cinco diluciones seriadas al tercio del compuesto (DTM/3, DTM/9, DTM/27, y así sucesivamente), se incluyeron dos placas por concentración. En cada ensayo se realizaron tres controles negativos para cada condición (cultivo bacteriano, mezcla S9 o amortiguador fosfato y DMSO) para determinar el número de colonias revertientes espontáneas, un control positivo para cada condición (cultivo bacteriano, mezcla S9 o amortiguador fosfato y compuesto mutagénico), y un control de fenotipo (PBS y cultivo bacteriano) para confirmar que la cepa utilizada fuese la correcta. Se incubaron los reactivos por 1 h a 37°C, luego se añadió a cada tubo de cultivo 2 mL de agar suplementado con trazas de histidina (0.5 mM) y biotina (0.5 mM) para permitir unas pocas divisiones celulares, termostatzado a 47°C, la mezcla se agitó en un vórtex y se vertió en placas de Petri con medio agar mínimo glucosa (AMG). Se realizaron movimientos circulares de la placa para distribuir el agar de manera uniforme en el medio de cultivo. Una vez que el agar solidificó, las placas de fenotipo se incubaron en posición invertida por 24 h, y las del ensayo de Ames se incubaron por 48 h a 37°C. En áreas previamente delimitadas de la placa de fenotipo (medio completo), se añadió cristal violeta (10 µL), ampicilina (10 µL), tetraciclina (10 µL), y a un tercio de la placa se iluminó con luz UV (10 s).

En la Tabla 5.2 se detallan los fenotipos característicos de cada cepa bacteriana.

**Tabla 5.2.** Fenotipos característicos de cada cepa de *S. typhimurium*.

Cepa	Fenotipo
TA98	Amp <sup>R</sup> , Tet <sup>S</sup> , CV <sup>S</sup> , UV <sup>S</sup>
TA100	Amp <sup>R</sup> , Tet <sup>S</sup> , CV <sup>S</sup> , UV <sup>S</sup>
TA102	Amp <sup>R</sup> , Tet <sup>R</sup> , CV <sup>S</sup> , UV <sup>R</sup>
TA1535	Amp <sup>S</sup> , Tet <sup>S</sup> , CV <sup>S</sup> , UV <sup>S</sup>
TA1537	Amp <sup>S</sup> , Tet <sup>S</sup> , CV <sup>S</sup> , UV <sup>S</sup>

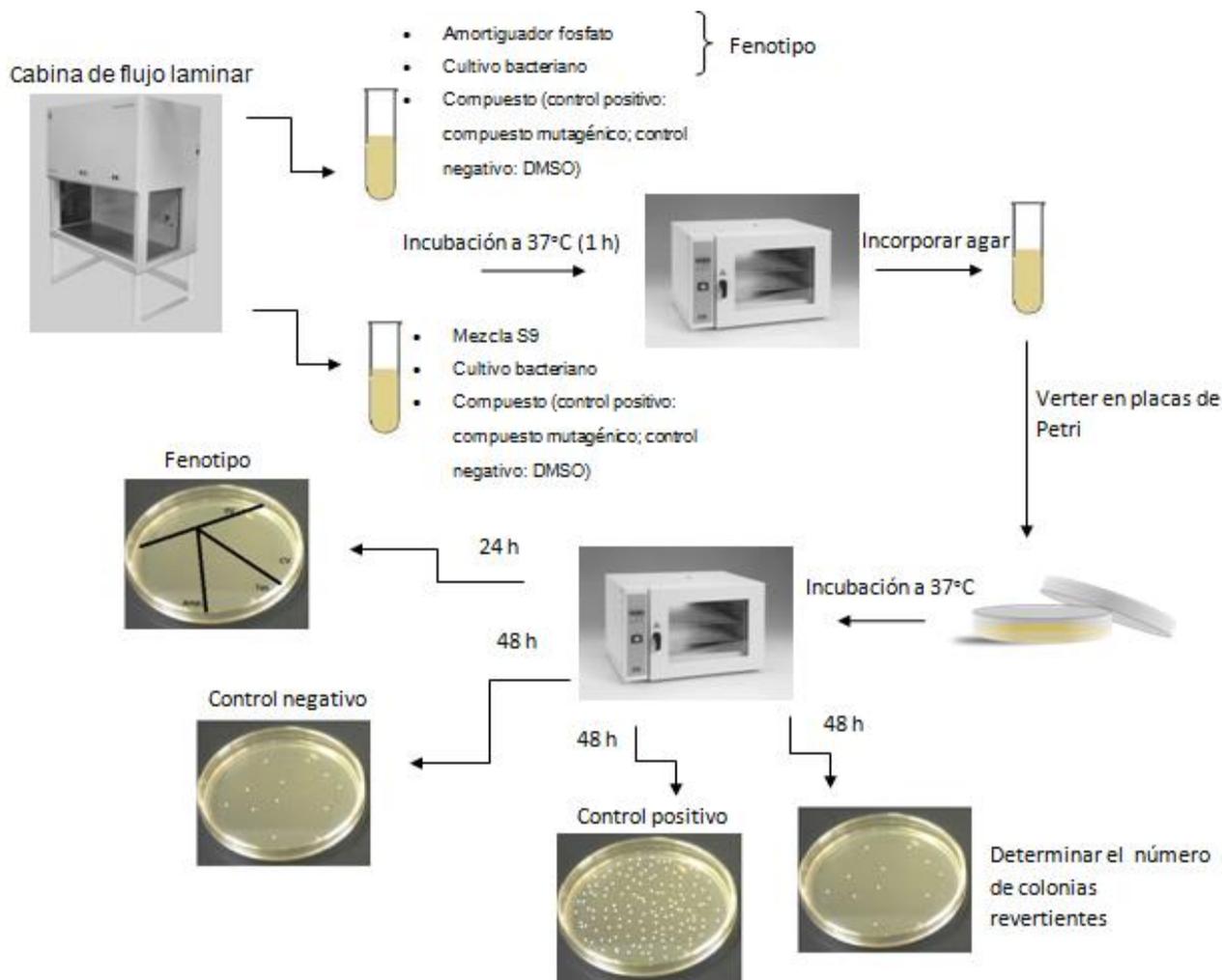
Amp<sup>R</sup>/Amp<sup>S</sup>: ampicilina resistente/ampicilina sensible; Tet<sup>R</sup>/Tet<sup>S</sup>: tetraciclina resistente/tetraciclina sensible; UV<sup>R</sup>/UV<sup>S</sup>: luz ultravioleta resistente/luz ultravioleta sensible; CV<sup>S</sup>: cristal violeta sensible.

Cumplidas las 48 h se procedió al recuento del número de colonias revertientes prototróficas His<sup>+</sup> formadas, debido al compuesto o de manera

espontánea, utilizando un contador manual y observando el crecimiento bacteriano de fondo. El resultado se comparó con el obtenido en las placas control negativas (colonias bacterianas formadas espontáneamente) para determinar la mutagenicidad o no del compuesto. Las colonias revertientes His<sup>+</sup> no dependen de la presencia de histidina en el medio de cultivo para su crecimiento. Se calculó el número promedio (n=2) de colonias revertientes y el desvío estándar para cada dosis del compuesto. Para los controles negativos se incluyó un n=3. Al añadir un compuesto mutagénico, el número de colonias revertientes aumenta de manera dosis-dependiente.

Las colonias de *S. typhimurium* son blancas, con superficie lisa y bordes regulares. La presencia de colonias con características diferentes indica contaminación (**Sandoval, 2008**). En la Figura 5.2 se muestra un esquema del ensayo de Ames.

Un compuesto es considerado mutagénico si el número promedio de colonias revertientes duplica en al menos dos niveles de dosis consecutivas el número de colonias revertientes del control negativo y se ve una relación dosis-dependiente. La baja concentración de His en el medio de cultivo permite varias divisiones celulares, se forma un césped bacteriano de fondo. La toxicidad es indicada por la reducción del número de colonias revertientes His<sup>+</sup>, o ausencia de césped de fondo (colonias auxótrofas). (**Gabay y cols, 2014**).



**Figura 5.2. Representación esquemática del ensayo de Ames.**

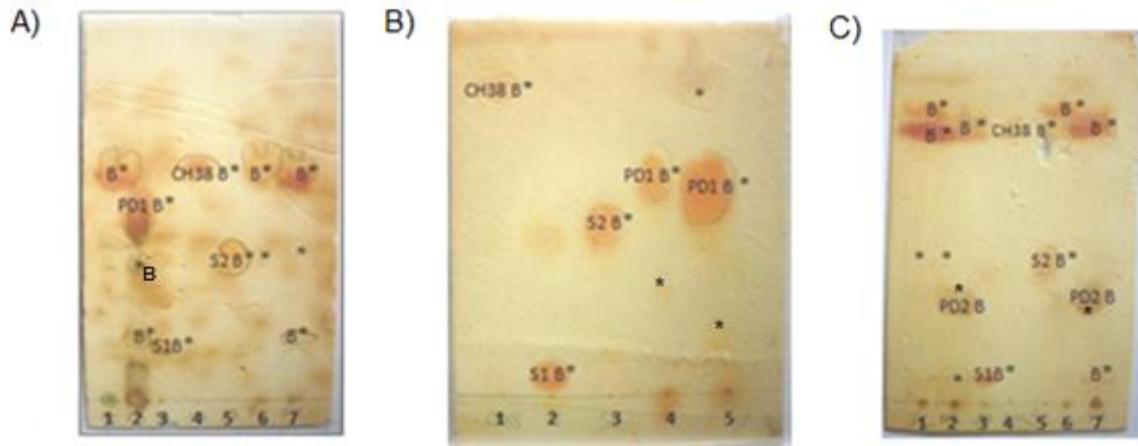
## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1. Análisis del metabolismo de CH38 por cromatografía en capa fina

Se realizaron estudios *in vitro* del perfil metabólico en los cuales la biotransformación o metabolismo del potencial fármaco CH38, por las fracciones microsomal (FM) y citosólica (FC) de hepatocitos de rata, fue investigada utilizando la técnica de CCF. Se evaluó el metabolismo de CH38 a diferentes tiempos de incubación (10, 20, 30 y 60 min). Se usaron los potenciales metabolitos, S1 y S2, como forma de corroborar su presencia después de la metabolización.

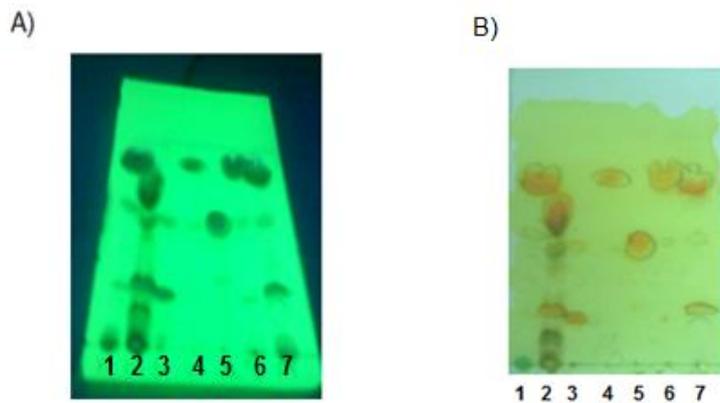
En la Figura 6.1 se muestran los resultados de las CCF a diferentes tiempos de incubación, se tuvieron en cuenta los productos más destacados. En FC a los 10 min se observa la presencia de CH38 y S2 (figura 6.1 C, carril 1); en FC a los 20 min se observa CH38 (figura 6.1 C, carril 6). En FC a los 30 min se observa la presencia de CH38 (figura 6.1 A, carril 1), y un producto desconocido 1 (PD1) con un desplazamiento ( $R_f$ ) mayor al de S2 (figura 6.1 B, carril 4). En esa misma fracción, transcurridos 60 min de metabolización, además de CH38 se visualiza un producto de  $R_f$  igual a S2 (figura 6.1 A, carril 6).

En FM a los 10 min se observa CH38, S2, S1, y un producto desconocido 2 (PD2) que posee un valor de  $R_f$  menor al de S2 (figura 6.1 C, carril 2); en FM a los 20 min se observa CH38, S1 y PD2 con el mismo valor de  $R_f$  que en el caso anterior (figura 6.1 C, carril 7). En FM a los 30 min se observan productos que se corresponden con S1, S2, CH38, y PD1 (figura 6.1 A, carril 2); transcurridos 60 min de reacción se observan productos correspondientes a CH38, S1 y S2 (figura 6.1 A, carril 7).



**Figura 6.1. Estudio de la metabolización *in vitro* de CH38 mediante cromatografía en capa fina (CCF).** **A:** Carriles: 1. FC (30 min), 2. FM (30 min), 3. patrón S1, 4. patrón CH38, 5. patrón S2, 6. FC (60 min), 7. FM (60 min); **B:** Carriles: 1. patrón CH38, 2. patrón S1, 3. patrón S2, 4. FC (30 min), 5. FM (30 min); **C:** Carriles: 1. FC (10 min), 2. FM (10 min), 3. patrón S1, 4. patrón CH38, 5. patrón S2, 6. FC (20 min), 7. FM (20 min). FC: fracción citosólica (entre paréntesis se indican los tiempos de incubación); FM: fracción microsomal (entre paréntesis se indican los tiempos de incubación); CH38: chalcona; S1 y S2 corresponden a los potenciales metabolitos sulfóxido y sulfona, respectivamente; PD1: producto desconocido 1; PD2: producto desconocido 2. Después del desarrollo, la CCF fue visualizada mediante revelado por exposición a luz UV a 254 nm (\*) y asperjado con reactivo de Brady (B).

En la Figura 6.2 se muestran dos cromatogramas con los productos obtenidos después de realizar el ensayo de metabolización a 30 y 60 min, en FM y FC, revelados con luz UV (A) y con reactivo de Brady (B). El revelado con reactivo de Brady es un revelado específico que se utiliza para identificar compuestos que posean grupos carbonilos. Esto permite definir exactamente que mancha de la CCF posee grupos carbonilos como el CH38, S1 y S2.



**Figura 6.2. Estudio de la metabolización *in vitro* de CH38 mediante cromatografía en capa fina (CCF). A y B:** Carriles: 1. FC (30 min), 2. FM (30 min), 3. patrón S1, 4. patrón CH38, 5. patrón S2, 6. FC (60 min), 7. FM (60 min). FC: fracción citosólica (entre paréntesis se indican los tiempos de incubación); FM: fracción microsomal (entre paréntesis se indican los tiempos de incubación); CH38: chalcona; S1 y S2 corresponden a los metabolitos sulfóxido y sulfona, respectivamente; PD1: producto desconocido 1; PD2: producto desconocido 2. Después del desarrollo, la CCF fue visualizada mediante revelado por exposición a luz UV a 254 nm (A) y asperjado con reactivo de Brady (B).

En la Tabla 6.1 se especifican los productos de la metabolización de la chalcona CH38 y la presencia de esta a diferentes tiempos de incubación, utilizando la técnica de CCF, revelado con luz UV y con reactivo de Brady.

**Tabla 6.1. Productos de la metabolización de CH38 y presencia de CH38, a diferentes tiempos de reacción, observados en las CCF, reveladas con luz UV y con reactivo de Brady.**

Tiempo de incubación (min)		10	20	30	60
Revelado con luz UV	CH38	FC-FM	FC-FM	FC-FM	FC-FM
	S1	FM	FM	FM	FM
	S2	FC-FM	ND	FM	FC-FM
	PD1	ND	ND	FM-FC	ND
	PD2	FM	FM	ND	ND
Revelado con reactivo de Brady	CH38	FC-FM	FC-FM	FC-FM	FC-FM
	S1	ND*	FM	FM	FM
	S2	ND*	ND*	FM	ND*
	PD1	ND	ND	FC-FM	ND
	PD2	FM	FM	ND	ND

CH38: potencial fármaco, S1 y S2: metabolitos principales, PD1 y PD2: productos desconocidos 1 y 2, respectivamente. FM: fracción microsomal, FC: fracción citosólica. ND: no detectado. ND\*: el revelado con luz UV fue más sensible que el revelado con reactivo de Brady, con éste no se identificaron los metabolitos.

La metabolización de CH38, por las fracciones microsomal y citosólica de hepatocitos de rata, aunque no es completa, transcurre principalmente en la fracción microsomal, observándose la aparición de los productos esperados de metabolización, los metabolitos S1 y S2.

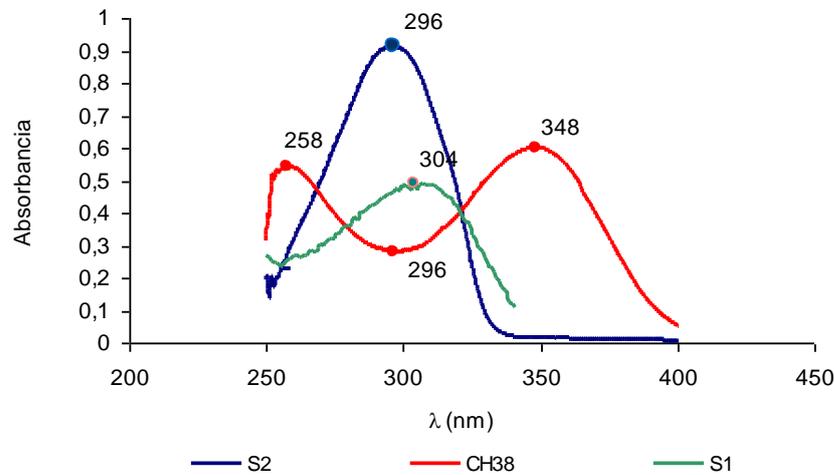
La detección de los productos de metabolización de CH38 utilizando diferentes reveladores, uno específico de la presencia de grupos carbonilos (Reactivo de Brady) y el otro universal permite reconocer que las manchas que se marcan como S1 y S2 y que revelan con exposición a la luz UV no coinciden con las reveladas con Brady. Lo que permite inferir que quizás sean coincidentes pero no los mismos productos.

Por lo que se plantea el estudio con detección y cuantificación de los productos que se obtienen.

## 6.2. Análisis espectrofotométricos

Mediante análisis espectrofotométrico se obtuvieron los espectros UV-visible de CH38, y de los metabolitos S1 y S2. A partir del espectro de absorción (absorbancia *vs.* longitud de onda), se determinó la longitud de onda máxima de absorción para cada compuesto. CH38 posee un pico máximo de absorción a 348 nm, S2 posee un

pico máximo de absorción a 296 nm, y S1 presenta un pico de máxima absorción a 304 nm (figura 6.3).



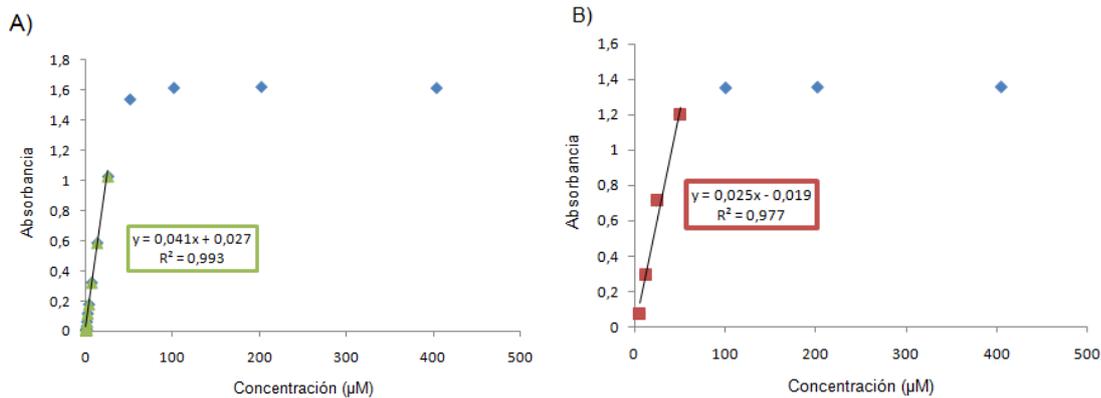
**Figura 6.3. Espectro de absorción del potencial fármaco CH38, y de sus metabolitos S1 y S2.** CH38 presenta dos picos de absorción a 258 y 348 nm, con un valle a 296 nm (línea roja); S2 presenta un pico máximo a 296 nm (línea azul), y S1 presenta un pico máximo a 304 nm (línea verde).

Si se observa el espectro de absorción de CH38, a 348 nm (figura 6.3) no hay interferencia espectral (no se observa solapamiento de los espectros) con los de los compuestos S1 y S2; en el pico de máxima absorción de S2 a 296 nm hay interferencia espectral por parte de CH38 y S1. S1 presenta interferencia espectral en su pico máximo de absorción a 304 nm con CH38 y S2.

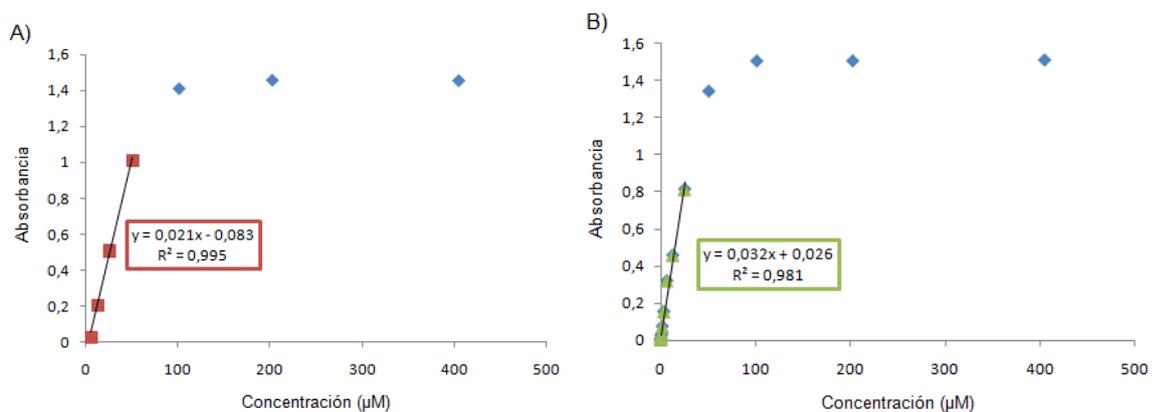
La ley de Lambert-Beer permite calcular la concentración de una sustancia a partir de la medida de la radiación absorbida por una disolución de la misma utilizando la siguiente ecuación:  $\text{Log}(I_0/I) = \epsilon bc = A$  (donde, A: absorbancia,  $\epsilon$ : absortividad molar, b: longitud de la cubeta, c: concentración,  $I_0$ : intensidad de la radiación incidente, I: intensidad de la radiación transmitida) (**Pedregal y Avendaño, 2001**). Para un análisis cuantitativo, utilizando los valores de los  $\epsilon$  de los compuestos, se puede hallar la concentración para cada compuesto, a un tiempo dado, y determinar si aumenta o disminuye la misma.

Se realizó una curva de calibración (absorbancia *vs.* concentración de la muestra) para S2 a 296 y 304 nm (figura 6.4), para S1 a 296 y 304 nm (figura 6.5) y para

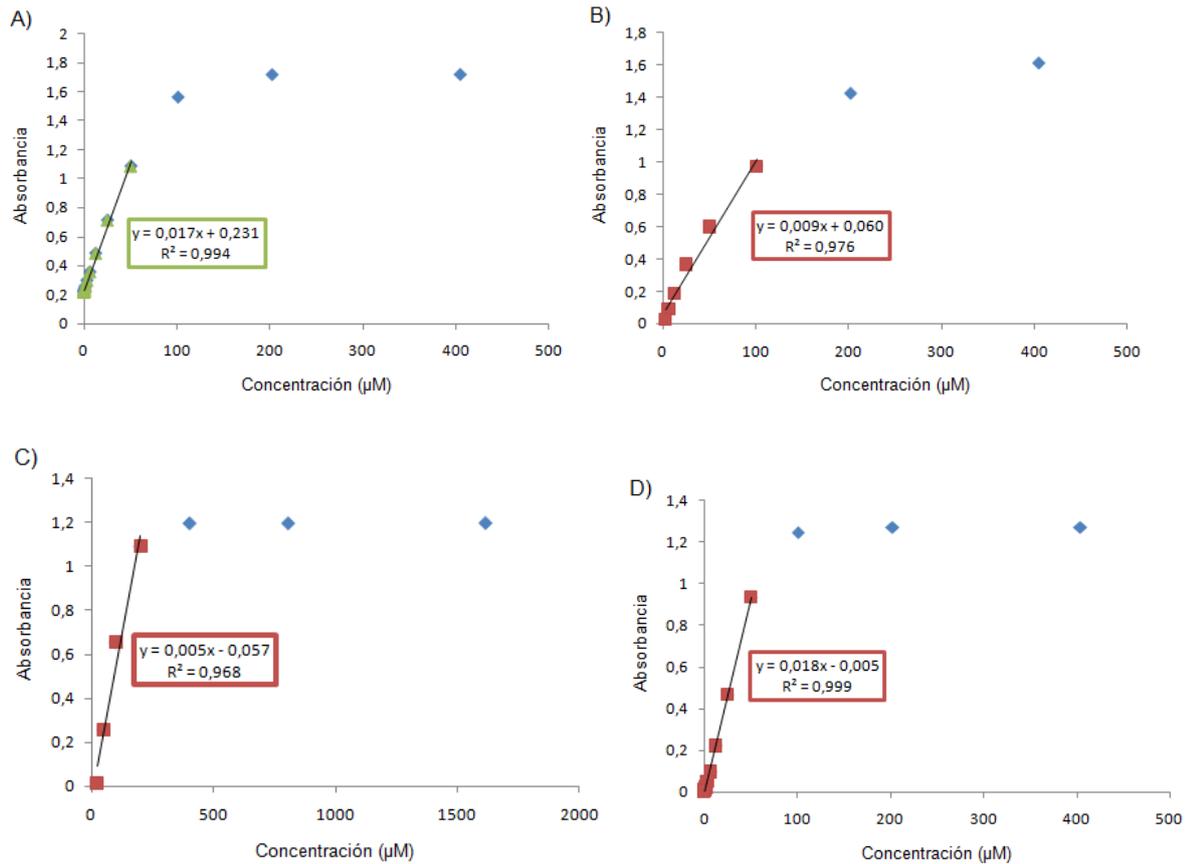
CH38 a 258, 296, 304 y 348 nm (figura 6.6). De esta manera se determinó la absorptividad molar ( $\epsilon$ ) para cada longitud de onda del potencial fármaco CH38 y de los principales metabolitos S1 y S2 (Tabla 6.3). De acuerdo a estos resultados se seleccionan las longitudes de onda de 258 y 348 nm como las más adecuadas para la determinación de la concentración de CH38 y 296 y 304 como las más adecuadas para los metabolitos S1 y S2.



**Figura 6.4. Curvas de calibración de S2.** A: 296 nm,  $\epsilon=0.0411 \mu\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ , B: 304 nm,  $\epsilon=0.025 \mu\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ .



**Figura 6.5. Curva de calibración de S1.** A: 296 nm, valor de  $\epsilon=0.0219 \mu\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ; B: 304 nm, valor de  $\epsilon=0.0327 \mu\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ .



**Figura 6.6. Curva de calibración de CH38.** A: 258 nm, valor de  $\epsilon=0.0175 \mu\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ; B: 296 nm, valor de  $\epsilon=0.0095 \mu\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ; C: 304 nm, valor de  $\epsilon=0.0059 \mu\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ; D: 348 nm, valor de  $\epsilon=0.0186 \mu\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ .

**Tabla 6.3. Valores de la absorptividad molar ( $\epsilon$ ) de CH38, S1 y S2 a sus longitudes de onda correspondientes.**

$\lambda$ (nm)	$\epsilon$ ( $\mu\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ )		
	CH38	S2	S1
258	0.018	ND	ND
296	0.0095	0.041	0.022
304	0.0059	0.025	0.032
348	0.019	ND	ND

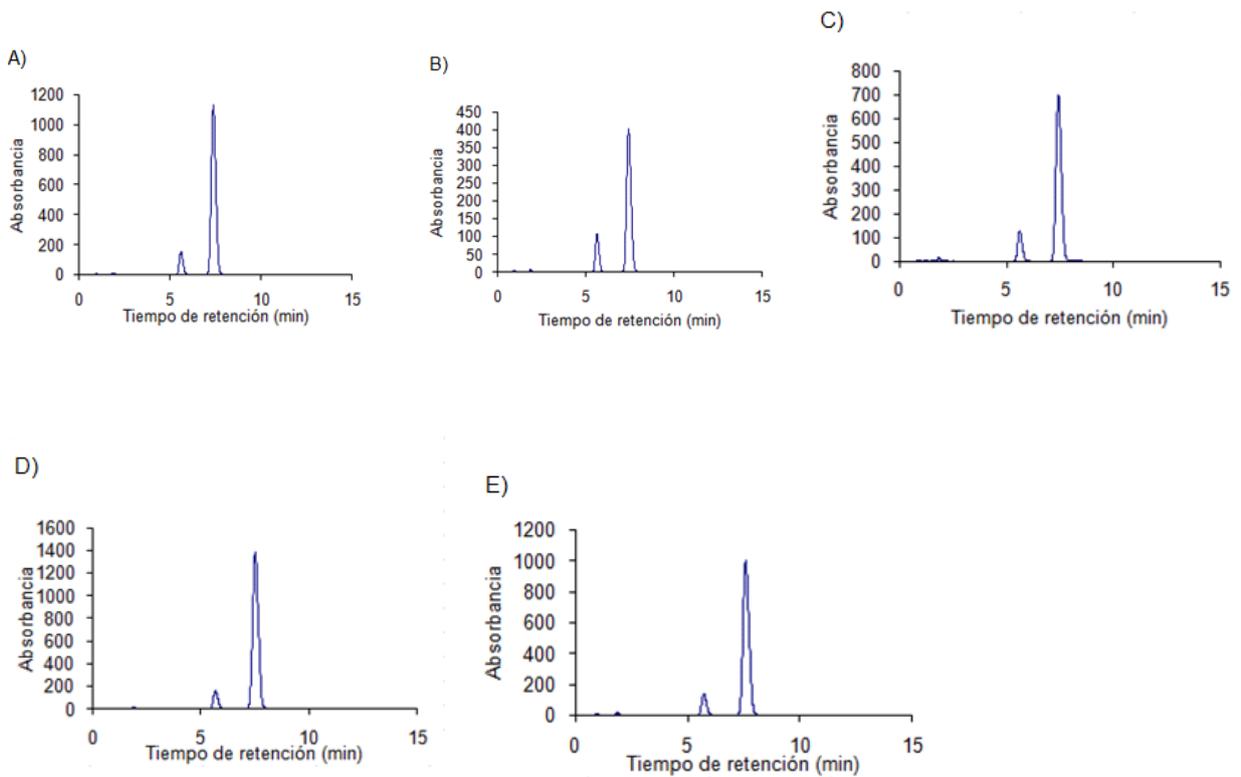
ND: valor no determinado.

### 6.3. Análisis por HPLC del metabolismo de CH38

Como forma de cuantificación de la metabolización por la fracción microsomal de hepatocito de rata de CH38 se realizó un estudio mediante la técnica de

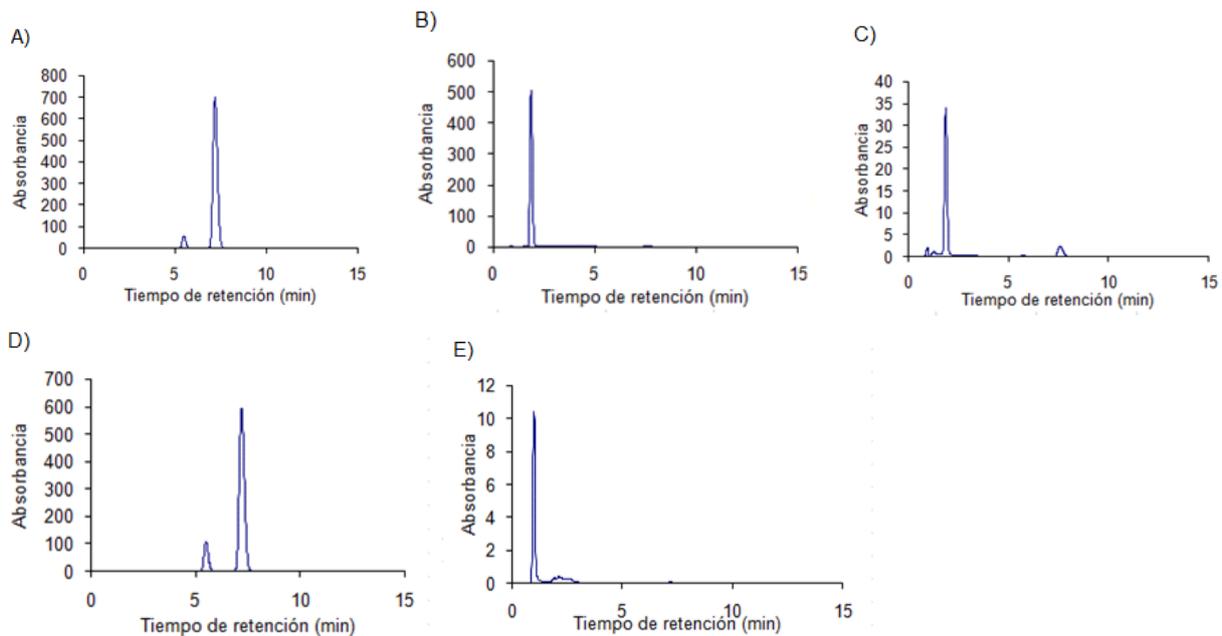
cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) con detección UV-vis a los 0, 10, 20, 30 y 60 min de incubación.

En la Figura 6.7 se muestran los cromatogramas a 348 nm en los cuales se evidencia la presencia de picos correspondientes a la metabolización de CH38, a los diferentes tiempos de incubación. Se observan dos picos principales, uno correspondería con PD1 y otro pico se correspondería con CH38 en todos los tiempos. Los metabolitos en este caso no se detectan porque en esta longitud de onda no absorben. Estos HPLC nos permiten evidenciar que CH38 no desaparece completamente en ninguna de las condiciones lo que implica que su metabolismo es parcial.



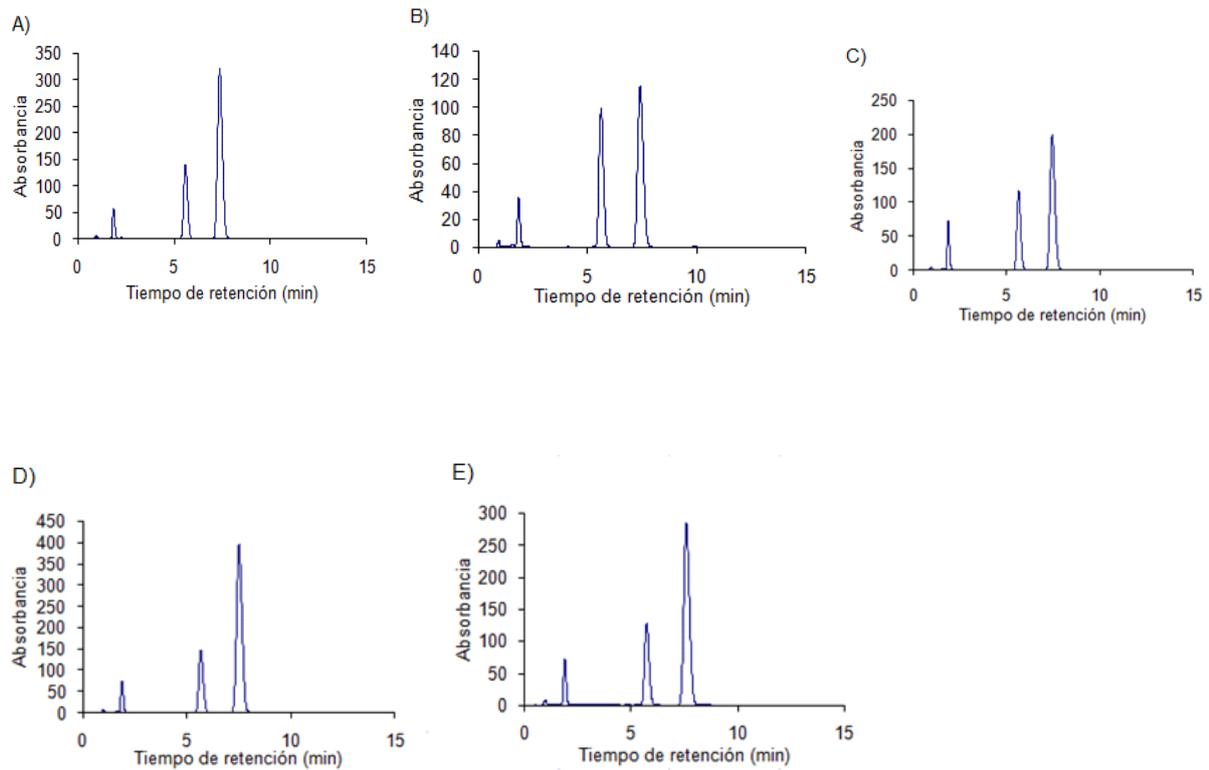
**Figura 6.7. Estudio de la metabolización de CH38 por FM a diferentes tiempos mediante HPLC.** Se muestran los cromatogramas a diferentes tiempos de incubación medidos a 348 nm. **A:** tiempo 0 min (7.4 min, 5.6 min), **B:** tiempo 10 min (7.4 min, 5.6 min, 1.9 min), **C:** tiempo 20 min (7.4 min, 5.6 min, 1.9 min), **D:** tiempo 30 min (7.5 min, 5.7 min, 1.9 min), **E:** tiempo 60 min (7.6 min, 5.7 min, 1.9 min). Entre paréntesis se indican los tiempos de retención de cada pico.

En la Figura 6.8 se muestran los cromatogramas a 348 nm correspondientes a los patrones CH38, S1, S2, y a los controles C(-)1 y C(-)2, éstos dos últimos incubados por 60 min. El C(-)1 presenta todos los reactivos de la metabolización excepto la fracción microsomal de forma de evaluar la estabilidad química de CH38, y el C(-)2 presenta todos los reactivos sin incluir el potencial fármaco CH38, como forma de eliminar posibles picos relativos a estos reactivos. De acuerdo a estos resultados se puede inferir que CH38 químicamente estable en las condiciones de metabolismo utilizadas. Ya que en las condiciones de C(-)1 en donde se colocan todos los reactivos menos la fracción microsomal y no se observa ningún cambio en los perfiles cromatográficos en ninguno de los tiempos ensayos.



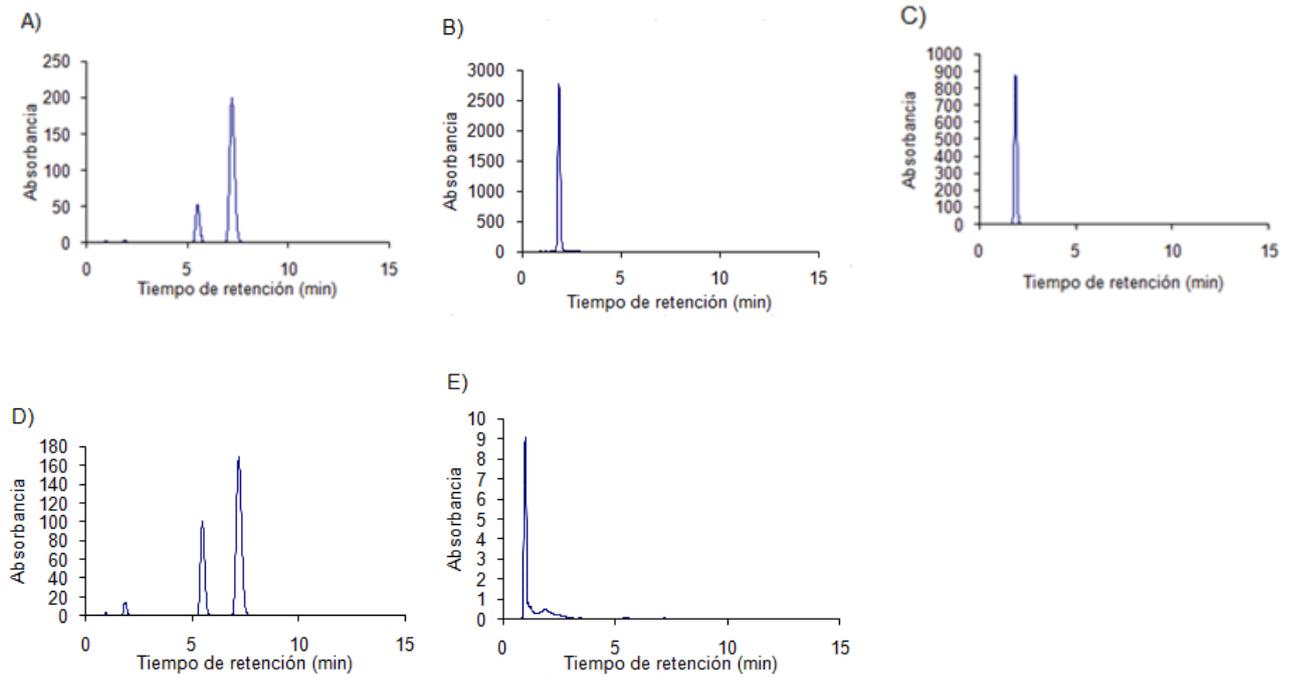
**Figura 6.8. HPLC de los cromatogramas de los patrones y controles negativos medidos a 348 nm.** **A:** patrón CH38 (7.2 min, 5.5 min), **B:** patrón S1 (1.9 min), **C:** patrón S2 (1.9 min), **D:** C(-)1 (7.2 min, 5.5 min), **E:** C(-)2 (0.98 min). C(-)1: control negativo 1, sin fracción microsomal; C(-)2: control negativo 2, sin el potencial fármaco CH38. Entre paréntesis se indican los tiempos de retención de cada pico.

En la Figura 6.9 se muestran los cromatogramas a 304 nm en los cuales se evidencia la presencia de picos correspondientes a la metabolización de CH38 a los diferentes tiempos de incubación, se observan tres picos principales, un pico correspondería a la mezcla S1-S2, otro pico correspondería a PD1 y el tercer pico correspondería a CH38. A esta longitud de onda de medida dado que es donde se tiene una mayor absorptividad molar de S1 y S2 es que se usará para cuantificar esta mezcla aunque como se puede apreciar CH38 también se evidencia.



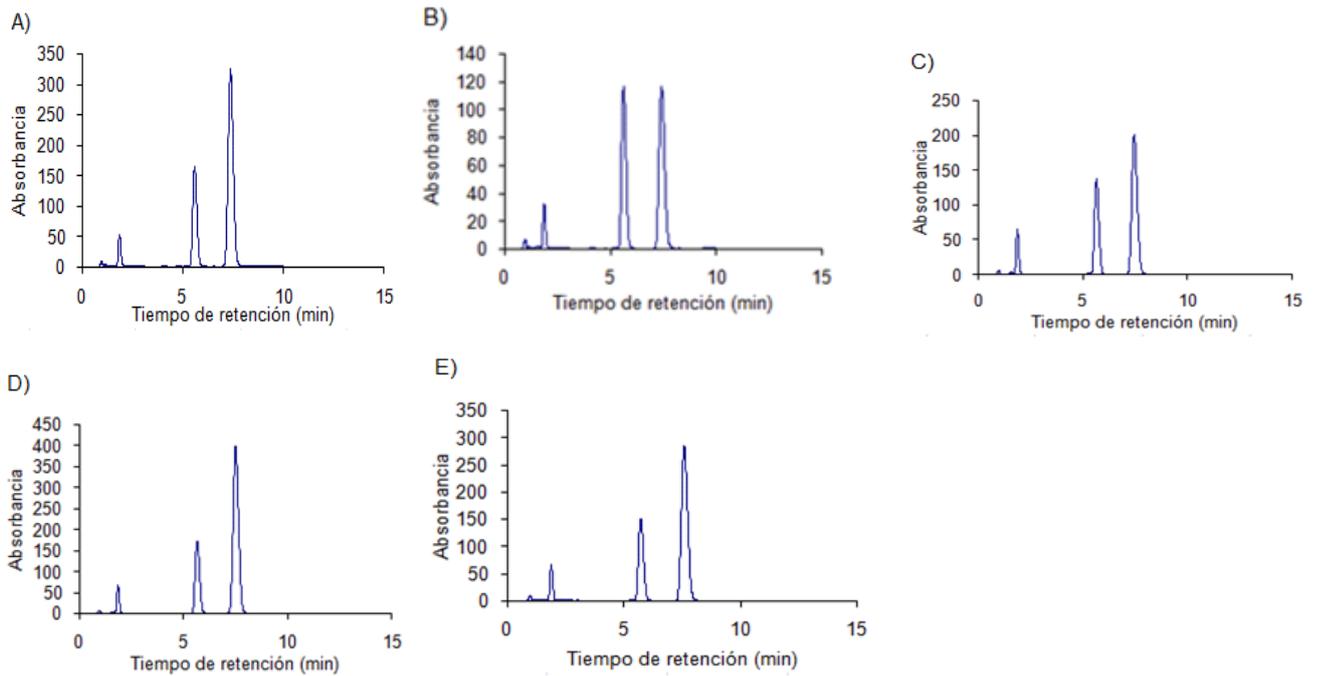
**Figura 6.9. Estudio de la metabolización de CH38 por FM mediante cromatografía HPLC.** Se muestran los cromatogramas a diferentes tiempos de incubación medidos a 304 nm. **A:** tiempo 0 min (7.4 min, 5.6 min, 1.8 min, 0.98 min), **B:** tiempo 10 min (7.4 min, 5.6 min, 1.9 min, 0.97 min), **C:** tiempo 20 min (7.4 min, 5.6 min, 1.9 min, 0.97 min), **D:** tiempo 30 min (7.5 min, 5.7 min, 1.9 min, 0.98 min), **E:** tiempo 60 min (7.6 min, 5.7 min, 1.9 min, 0.98 min). Entre paréntesis se indican los tiempos de retención de cada pico.

En la Figura 6.10 se muestran los cromatogramas a 304 nm correspondientes a los patrones de CH38, S1, S2, y a los controles C(-)1 y C(-)2, éstos dos últimos incubados por 60 min. Al igual que en el caso de lo mostrado en la Figura 6.8 se aprecia que no hay cambios por reacciones químicas de CH38.



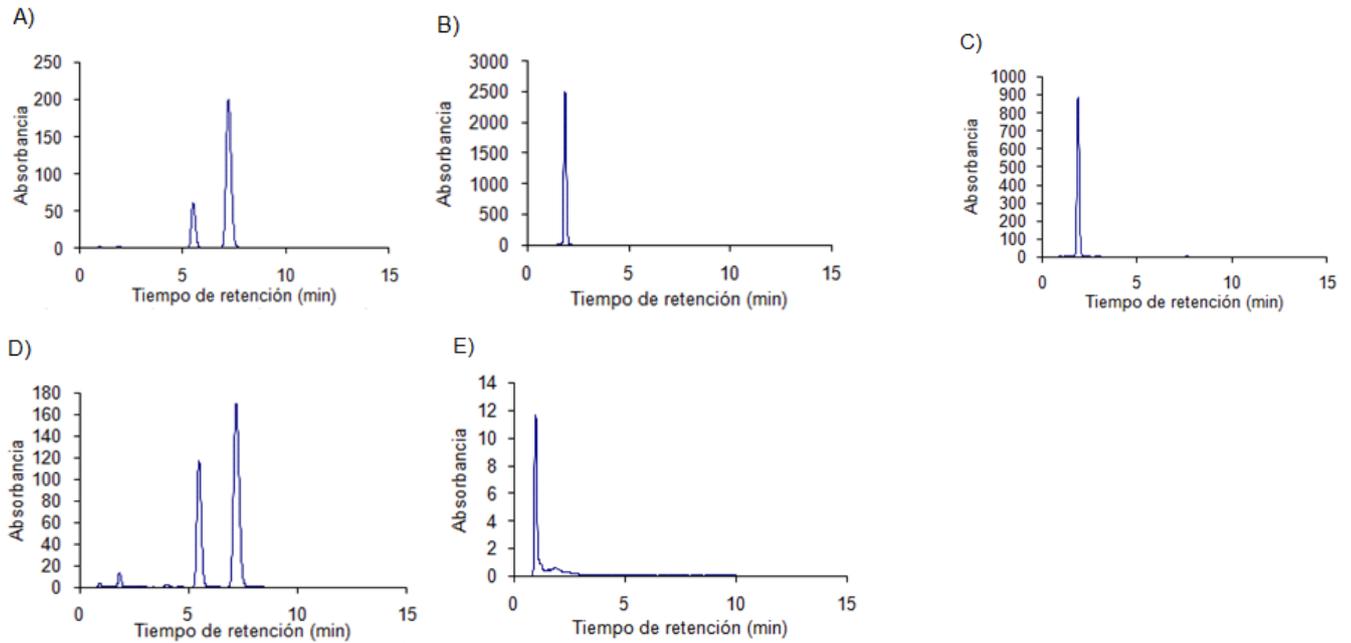
**Figura 6.10. Cromatografía líquida de alto rendimiento HPLC de los patrones y controles negativos medidos a 304 nm. A:** patrón CH38 (7.2 min, 5.5 min), **B:** patrón S1 (1.9 min), **C:** patrón S2 (1.9 min), **D:** C(-)1 (7.2 min, 5.5 min, 1.8 min, 0.96 min), **E:** C(-)2 (0.97 min). C(-)1: control negativo 1, sin fracción microsomal; C(-)2: control negativo 2, sin el potencial fármaco CH38. Entre paréntesis se indican los tiempos de retención de cada pico.

En la Figura 6.11 se muestran los cromatogramas a 296 nm en los cuales se evidencia la presencia de picos correspondientes a la metabolización de CH38 a los diferentes tiempos de incubación, se observan tres picos principales, un pico correspondería a la mezcla S1-S2, otro pico correspondería al PD1 y el tercer pico correspondería con CH38. Al igual a lo que se evidencia en la Figura 6.9 en estas condiciones se observa la aparición de la mezcla de los dos metabolitos lo que permitiría su cuantificación en la mezcla de reacción metabólica.



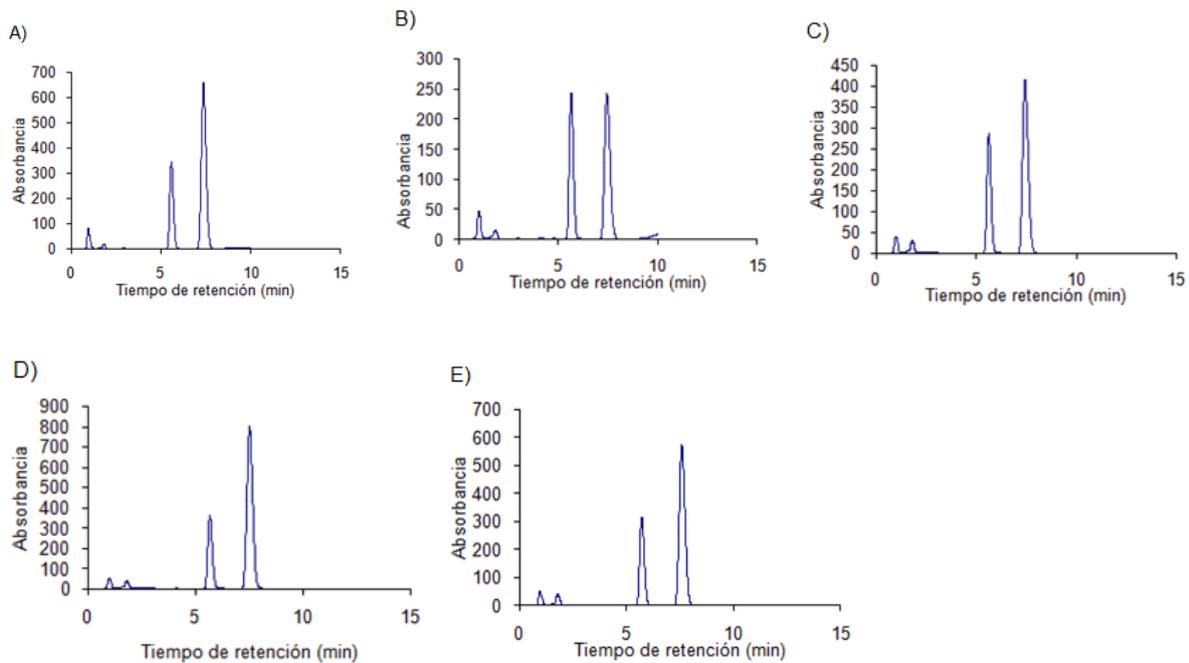
**Figura 6.11. Estudio de la metabolización de CH38 por FM mediante cromatografía HPLC.** Se muestran los cromatogramas a diferentes tiempos de incubación medidos a 296 nm. **A:** tiempo 0 min (7.4 min, 5.6 min, 1.8 min, 0.98 min), **B:** tiempo 10 min (7.4 min, 5.6 min, 1.9 min, 0.97 min), **C:** tiempo 20 min (7.4 min, 5.6 min, 1.9 min, 0.98 min), **D:** tiempo 30 min (7.5 min, 5.7 min, 1.9 min, 0.98 min), **E:** tiempo 60 min (7.6 min, 5.7 min, 1.9 min, 0.98 min). Entre paréntesis se indican los tiempos de retención de cada pico.

En la Figura 6.12 se muestran los cromatogramas a 296 nm correspondientes a los patrones CH38, S1, S2, y a los controles C(-)1 y C(-)2, éstos dos últimos incubados por 60 min. Se observa también en estas condiciones de detección que CH 38 no sufre reacciones químicas en las condiciones de metabolización.



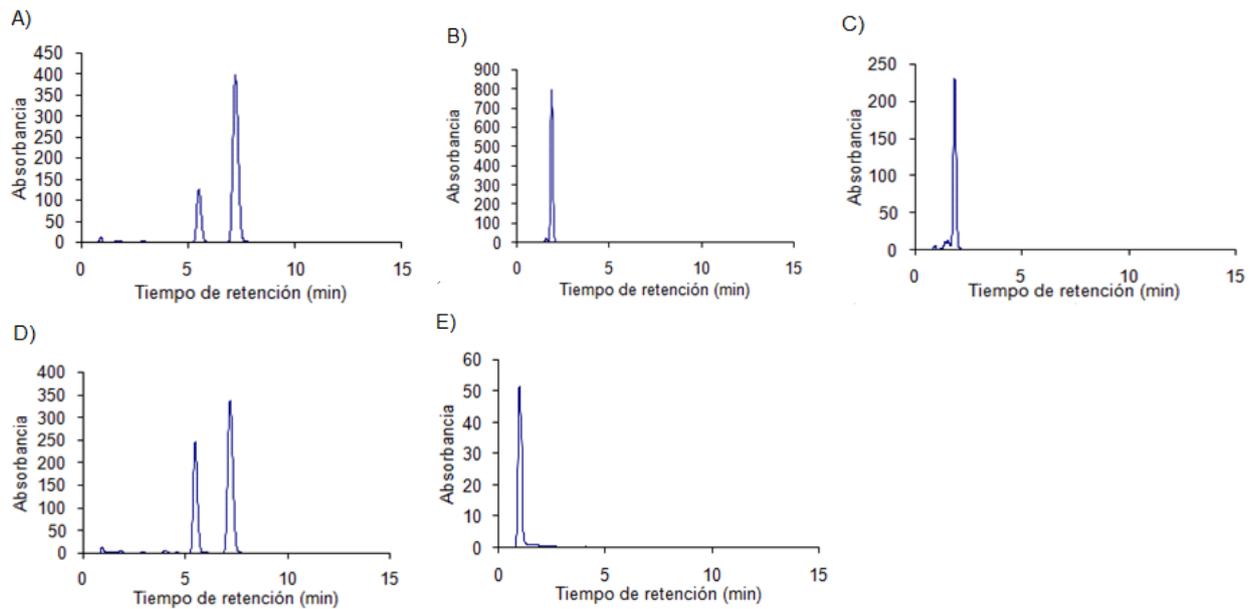
**Figura 6.12. HPLC de los cromatogramas de los patrones y controles negativos medidos a 296 nm.** **A:** patrón CH38 (7.2 min, 5.5 min), **B:** patrón S1 (1.9 min), **C:** patrón S2 (1.9 min), **D:** C(-)1 (7.2 min, 5.5 min, 1.8 min, 0.97 min), **E:** C(-)2 (0.96 min). C(-)1: control negativo 1, sin fracción microsomal; C(-)2: control negativo 2, sin el potencial fármaco CH38. Entre paréntesis se indican los tiempos de retención de cada pico.

En la Figura 6.13 se muestran los cromatogramas a 258 nm en los cuales se evidencia la presencia de picos correspondientes a la metabolización de CH38 a los diferentes tiempos de incubación, se observan tres picos principales, un pico correspondería a la mezcla S1-S2, otro pico correspondería al PD1 y el tercer pico correspondería con CH38.

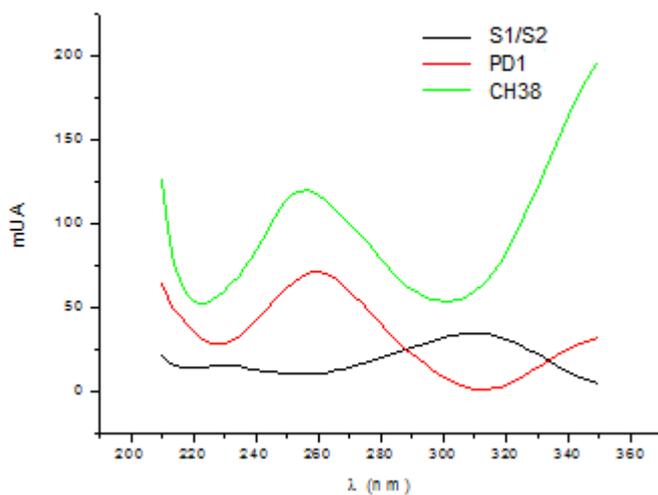


**Figura 6.13. Estudio de la metabolización de CH38 por FM mediante HPLC.** Se muestran los cromatogramas a diferentes tiempos de incubación medidos a 258 nm. **A:** tiempo 0 min (7.4 min, 5.6 min, 1.8 min, 0.96 min), **B:** tiempo 10 min (7.4 min, 5.6 min, 1.8 min, 0.98 min), **C:** tiempo 20 min (7.4 min, 5.6 min, 1.8 min, 0.98 min), **D:** tiempo 30 min (7.5 min, 5.7 min, 1.8 min, 0.98 min), **E:** tiempo 60 min (7.6 min, 5.7 min, 1.8 min, 0.97 min). Entre paréntesis se indican los tiempos de retención de cada pico.

En la Figura 6.14 se muestran los cromatogramas a 258 nm correspondientes a los patrones CH38, S1, S2, y a los controles C(-)1 y C(-)2, éstos dos últimos incubados por 60 min. En la Figura 6.15 se muestran los espectros UV de la mezcla S1/S2, PD1 y CH38 obtenidos en los picos del HPLC de la metabolización a los 60 min.



**Figura 6.14. Análisis por HPLC de los patrones y controles negativos medidos a 258 nm.** A: patrón CH38 (7.2 min, 5.5 min), B: patrón S1 (1.9 min), C: patrón S2 (1.9 min), D: C(-)1 (7.2 min, 5.5 min, 0.91 min), E: C(-)2 (0.97 min). C(-)1: control negativo 1, sin fracción microsomal; C(-)2: control negativo 2, sin el potencial fármaco CH38. Entre paréntesis se indican los tiempos de retención de cada pico.

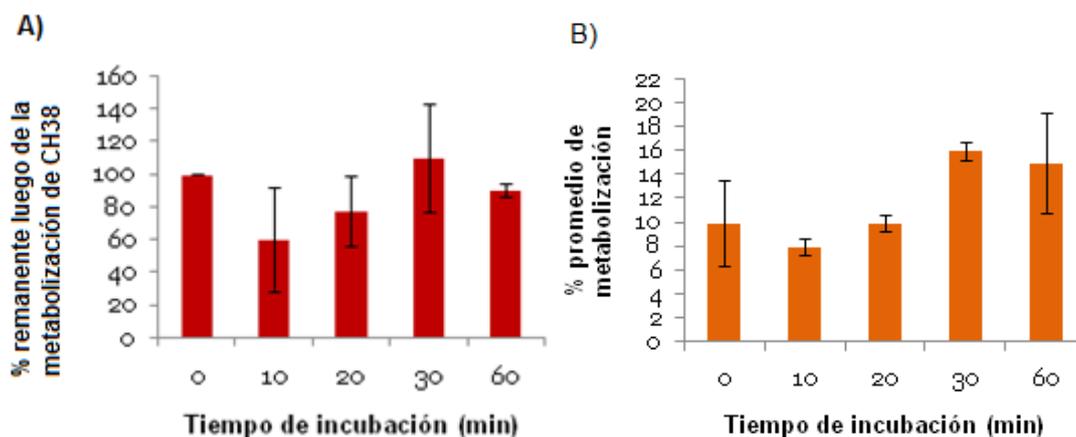


**Figura 6.15. Espectro UV de cada pico presente en los cromatogramas.**

Lamentablemente para los metabolitos S1 y S2 no fue posible encontrar un método de separación adecuado por lo que ambos se evalúan en forma conjunta. Para observar su producción se utilizan las diferentes condiciones de detección a diferentes longitudes de onda.

A partir de estos estudios se puede observar que CH38 se metaboliza como se había observado por CCF a los productos S1 y S2 en tiempos variables. Por lo que para proceder a la cuantificación del avance de la metabolización con el tiempo se grafica el porcentaje promedio de metabolización de CH38 en función del tiempo de incubación (0, 10, 20, 30 y 60 min). Con los datos del área bajo la curva de cada pico, para cada longitud de onda y para cada tiempo de incubación, se calculó el porcentaje promedio de dos ensayos de metabolización.

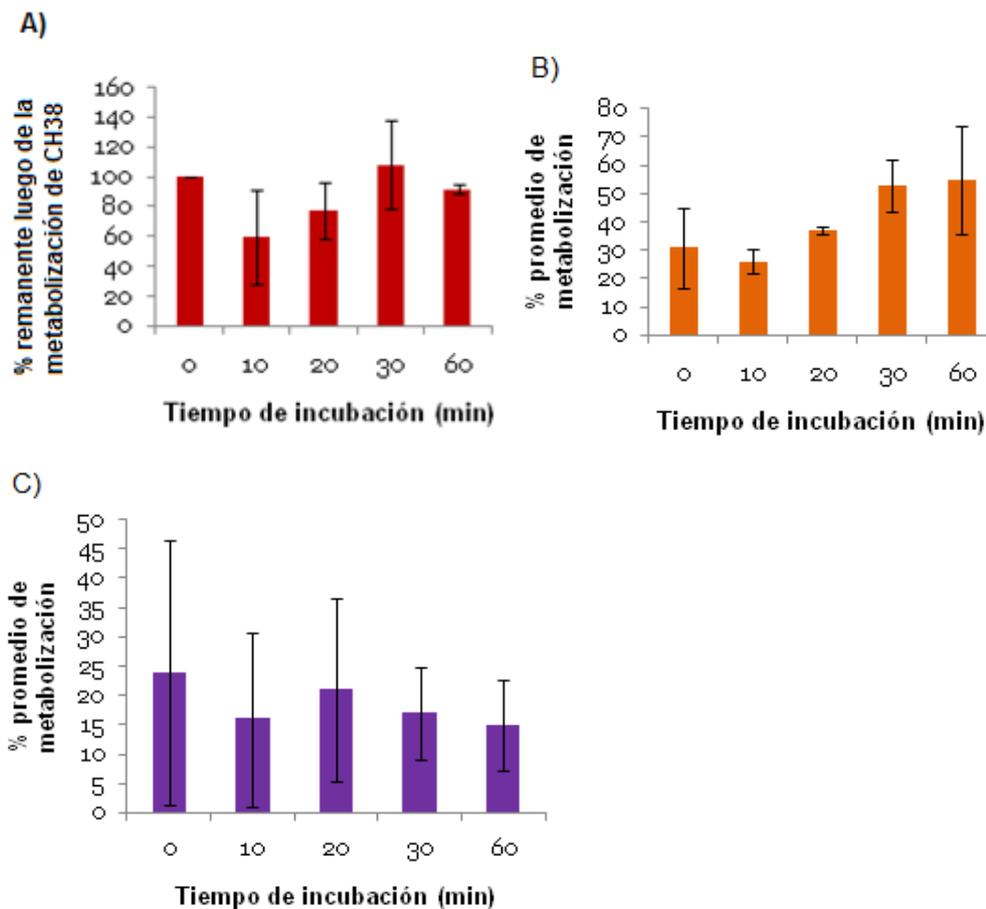
En la Figura 6.16 se muestran los gráficos del porcentaje de metabolización de CH38 a diferentes tiempos de incubación, a 348 nm, con sus desvíos estándar. El potencial fármaco parece disminuir su concentración relativa a los 10 min, luego va aumentando hasta los 30 min y decrece nuevamente a los 60 min pero ninguno de estos cambios son estadísticamente significativos de acuerdo al test *t*-student (figura 6.16 A). En el caso del PD, se observa el mismo comportamiento que para CH38 siendo no significativa de acuerdo al test *t*-student (Figura 6.16 B). Los metabolitos S1/S2 en esta longitud de onda no fueron estudiados dado que en esta longitud de onda su absortividad es muy baja no detectable.



**Figura 6.16. Porcentaje de la metabolización de CH38 en relación al tiempo de incubación medido a 348 nm. A:** CH38; **B:** PD. Con respecto al control (tiempo 0 min) la desviación estadística a los tiempos 0, 10, 20, 30, 60 min de acuerdo al *t*- Student es no significativa.

En la Figura 6.17 se muestran los gráficos del porcentaje de metabolización de CH38 a diferentes tiempos de incubación, determinados a 296 nm, con sus desvíos estándar. Al igual que lo que se observa en la longitud de onda de 348 nm el metabolismo de CH38 no presenta cambios significativos (figura 6.17 A). En el caso

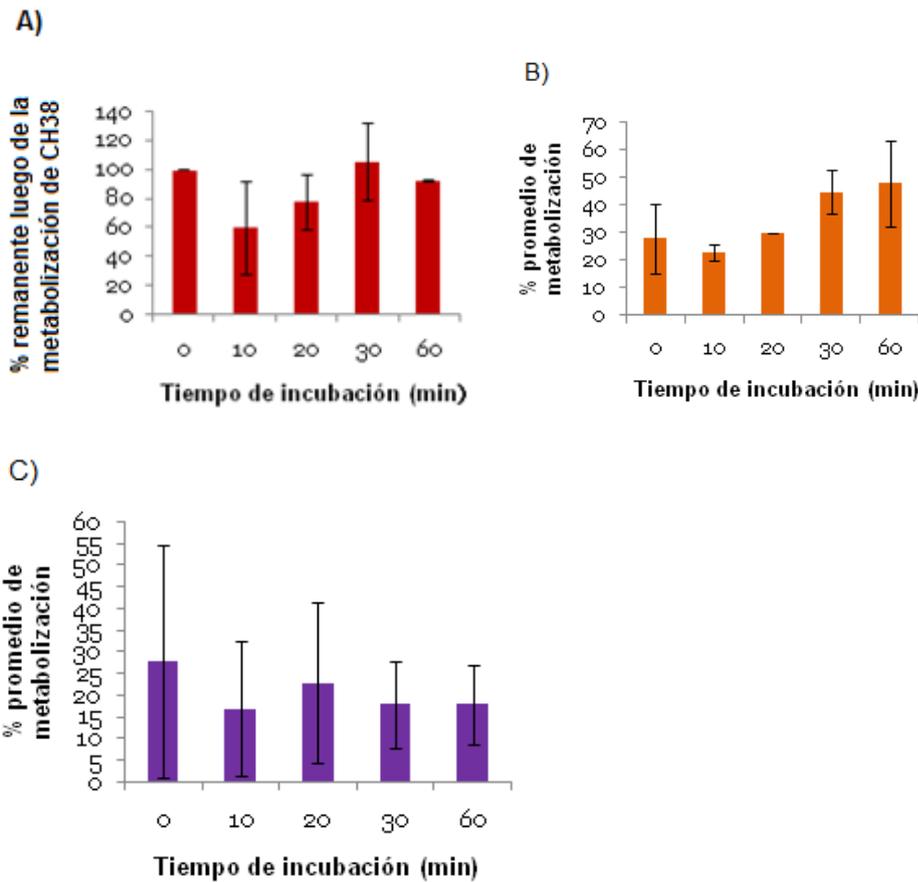
del PD, se observa el mismo comportamiento que para CH38 hasta los 30 min, luego la concentración parece seguir aumentando a los 60 min aunque en ningún caso es estadísticamente significativo (figura 6.17 B). Para los metabolitos S1/S2, se observa su aparición a los 10 min la cual se mantiene constante a lo largo del tiempo (figura 6.17 C). El porcentaje relativo de aparición de S1/S2 es de 15-20% con respecto a CH38.



**Figura 6.17. Porcentaje de la metabolización de CH38 en relación al tiempo de incubación medido a 296 nm. A: CH38; B: PD; C: S1/S2.** Con respecto al control (tiempo 0 min) la desviación estadística a los tiempos 0 , 10, 20, 30, 60 min de acuerdo al t- Student es no significativa.

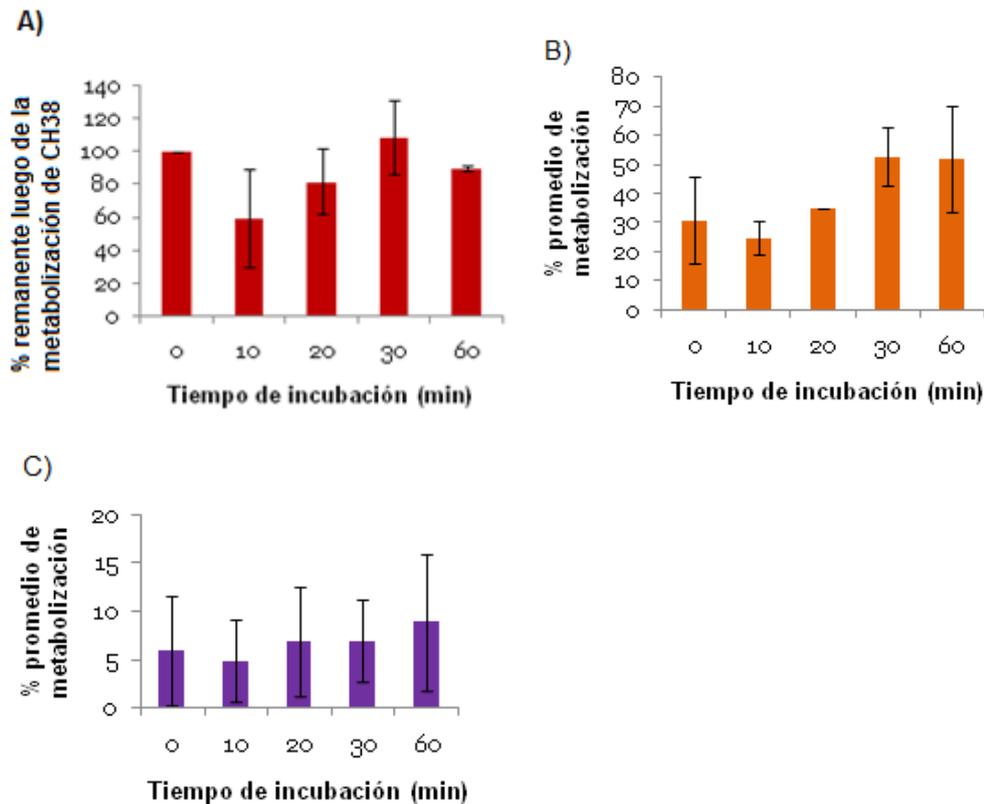
En la Figura 6.18 se muestran los gráficos del porcentaje de metabolización de CH38 a diferentes tiempos de incubación, determinados a 304 nm, con sus desvíos estándar. En este caso al igual que todos los anteriores CH38 no cambia significativamente (figura 6.18 A). Lo mismo se evidencia para PD1 (Figura 6.18 B).

Para los metabolitos S1/S2, se observa el mismo comportamiento es con una producción dentro de 15-20 %. (figura 6.18 C).



**Figura 6.18. Porcentaje de la metabolización de CH38 en relación al tiempo de incubación medido a 304 nm. A:** CH38; **B:** PD; **C:** S1/S2. Con respecto al control (tiempo 0 min) la desviación estadística a los tiempos 0 , 10, 20, 30, 60 min de acuerdo al t- Student es no significativa.

En la Figura 6.19 se presentan los gráficos del porcentaje de metabolización de CH38 a diferentes tiempos de incubación, determinados a 258 nm, con sus desvíos estándar. El potencial fármaco parece disminuir su concentración a los 10 min, luego parece ir en aumento hasta los 30 min y decreciendo a los 60 min (figura 6.19 A), aunque los cambios no tienen significancia estadística. En el caso del PD, se observa el mismo comportamiento que para CH38 hasta los 30 min, luego la concentración se mantiene constante a los 60 min (figura 6.19 B). Para los metabolitos S1/S2 la concentración se mantiene constante a lo largo del tiempo (figura 6.19 C).



**Figura 6.19. Porcentaje de la metabolización de CH38 en relación al tiempo de incubación medido a 258 nm. A: CH38; B: PD; C: S1/S2.** Con respecto al control (tiempo 0 min) la desviación estadística a los tiempos 0, 10, 20, 30, 60 min de acuerdo al t- Student es no significativa.

## 6.4. Ensayo de Ames

### 6.4.1. Ensayo de toxicidad

La DTM se determinó para el potencial fármaco CH38 y de los metabolitos S1 y S2, a ser utilizada en el ensayo de Ames. Este ensayo se realizó en la cepa TA98 de *S. typhimurium*. Se ensayó la máxima concentración sugerida por OECD (**OECD, 1997**). Las concentraciones usadas por tanto fueron 5000  $\mu\text{g}/\text{placa}$  de cada compuesto y se realizaron cuatro diluciones seriadas al décimo obteniendo cinco concentraciones diferentes.

Si se observa crecimiento bacteriano de fondo (césped), a una concentración dada, el compuesto evaluado no es tóxico; ante un compuesto moderadamente tóxico, se observan áreas sin crecimiento y esa condición se denomina césped parcial; si un

compuesto es tóxico hay ausencia de crecimiento bacteriano de fondo. En la Tabla 6.4 se muestran los resultados del ensayo de toxicidad en la cepa TA98 de *S. typhimurium*.

**Tabla 6.4. Resultados del ensayo de toxicidad utilizando la cepa TA98 de *S. typhimurium* del potencial fármaco CH38 y de los metabolitos principales S1 y S2.**

Compuesto	Dosis (µg/placa)	A	B*	Observaciones
CH38	5000	Césped parcial	Césped parcial	Precipitación del compuesto
	500	Césped	Césped parcial	
	50	Césped	Césped	
	5	Césped	Césped	
	0.5	Césped	Césped	
S2	5000	Tóxico	Tóxico	Precipitación del compuesto
	500	Césped parcial	Césped parcial	
	50	Césped parcial	Césped parcial	
	5	Césped	Césped	
	0.5	Césped	Césped	
S1	5000	Tóxico	Tóxico	Precipitación del compuesto
	500	Tóxico	Tóxico	
	50	Césped	Césped parcial	
	5	Césped	Césped	
	0.5	Césped	Césped	

\*B: el experimento se realizó por duplicado.

A partir de los resultados obtenidos en el ensayo de toxicidad (Tabla 6.4), se determinó la DTM para cada compuesto a evaluar, como dosis máxima de partida para el ensayo de Ames, teniendo en cuenta los criterios que se emplean en nuestro laboratorio como se muestran en la Tabla 6.5 (Gabay y cols, 2014). Las concentraciones máximas obtenidas para S1, S2 y CH38 fueron las siguientes: 150 µg/placa, 40 µg/placa y 400 µg/placa, respectivamente.

**Tabla 6.5. Criterio establecido por el Grupo de Química Medicinal de posibles resultados del ensayo de toxicidad que permiten calcular la DTM utilizada en el ensayo de Ames como dosis máxima de estudio.**

Ensayo de toxicidad	Dosis 1 (dosis máxima)	Dosis 2	Dosis 3	Dosis 4	Dosis 5 (dosis mínima)	Dosis máxima (ensayo de Ames)
Situación 1	Tóxico	Césped	Césped	Césped	Césped	Dosis 2x3
Situación 2	Tóxico	Tóxico	Césped	Césped	Césped	Dosis 3x3
Situación 3	Tóxico	Tóxico	Tóxico	Césped	Césped	Dosis 4x3
Situación 4	Tóxico	Tóxico	Tóxico	Tóxico	Césped	Dosis 5x3
Situación 5	Tóxico	Microcolonias	Césped	Césped	Césped	Dosis 3x4
Situación 6	Microcolonias	Césped	Césped	Césped	Césped	Dosis 2x4
Situación 7	Césped parcial	Césped	Césped	Césped	Césped	Dosis 1x0.8
Situación 8	Césped (alta precipitación del compuesto)	Césped	Césped	Césped	Césped	Dosis 1x0.5
Situación 9	Césped (baja precipitación del compuesto)	Césped	Césped	Césped	Césped	Dosis 1x0.8

#### 6.4.2. Estudio de mutagenicidad mediante ensayo de Ames

Se realizaron estudios de mutagenicidad *in vitro*, mediante ensayo de Ames (OECD, 1997), para evaluar el potencial fármaco CH38 y sus metabolitos S1 y S2. Se utilizaron las cepas TA98, TA100, TA102, TA1537 y TA1535 de *S. typhimurium*. El ensayo de Ames se realizó en presencia (5% S9) y en ausencia de activación metabólica (0% S9) utilizando cinco concentraciones de cada compuesto. Se incluyeron tres controles negativos (DMSO), para cada condición, en los cuales se observa el crecimiento de colonias revertientes espontáneas, y un control positivo

(compuesto mutagénico), para cada condición, en el cual se observa el crecimiento de muchas colonias bacterianas. Un compuesto es mutagénico si el número de colonias revertientes es al menos dos veces mayor que el del control negativo y se observa una relación dosis-respuesta (**Chu y cols, 1981**).

Las Tablas 6.6, 6.7, 6.8, 6.9 y 6.10, expresan los resultados del ensayo de Ames en las diferentes cepas bacterianas utilizadas, se muestra el número promedio (n=2) de colonias revertientes/placa y el desvío estándar (media ± DE).

Ninguno de los compuestos evaluados resultó ser mutagénico en las cinco cepas evaluadas de *S. typhimurium*, por lo que se puede proseguir con otros ensayos preclínicos.

**Tabla 6.6. Ensayo de Ames del potencial fármaco CH38 y de sus metabolitos S1 y S2.**

Compuesto	Dosis (µg/placa)	NR ± DE <sup>a</sup>	
		SAM <sup>b</sup>	CAM <sup>c</sup>
CH38	400	12±2	13±3 (Toxicidad)
	133	10±0	12±4
	44	10±2	10±5
	15	8±4	15±2
	5	11±2	15±1
S1	150	11±4 (Toxicidad)	10±2
	50	13±4	12±1
	17	9±2	9±1
	6	14±6	13±4
	2	13±4	8±3
S2	40	17±4	16±4
	13	13±3	13±2
	4	13±6	11±1
	1.5	12±3	12±2
	0.5	14±1	14±8
C (-)*	-	9±2	16±4
C (+)**	-	796	536

<sup>a</sup>NR ± DE: número promedio (n=2) de revertientes His+ ± desvío estándar. <sup>b</sup> SAM: Sin activación metabólica. <sup>c</sup> CAM: Con activación metabólica.

\*C(-): control negativo, dimetilsulfóxido (DMSO) 0.5%.

\*\*C(+): control positivo, 4-nitro-*o*-fenilendiamina (4NPD, 20 µg/placa, SM), 2-aminofluoreno (2AF, 10 µg/placa, 5 % S9).

Se indica el número promedio de colonias revertientes His+ de la cepa TA98 de *S. typhimurium*, en ausencia (0 % S9) y en presencia de activación metabólica (5 % S9).

**Tabla 6.7. Ensayo de Ames del potencial fármaco CH38 y de sus metabolitos S1 y S2.**

Compuesto	Dosis ( $\mu\text{g/placa}$ )	NR $\pm$ DE <sup>a</sup>	
		SAM <sup>b</sup>	CAM <sup>c</sup>
CH38	400	29 $\pm$ 7 (Precipitación)	90 $\pm$ 15
	133	37 $\pm$ 37 (Precipitación, toxicidad)	102 <sup>***</sup>
	44	63 $\pm$ 13 (Toxicidad)	102 <sup>***</sup>
	15	75 <sup>***</sup>	102 $\pm$ 8
	5	80 $\pm$ 2	83 $\pm$ 11
S1	150	38 $\pm$ 29 (Toxicidad, césped parcial)	113 $\pm$ 23
	50	61 <sup>***</sup>	123 $\pm$ 5
	17	57 $\pm$ 10	107 $\pm$ 1
	6	77 $\pm$ 4	112 $\pm$ 11
	2	71 $\pm$ 9	108 $\pm$ 9
S2	40	50 $\pm$ 23	132 $\pm$ 1
	13	83 $\pm$ 7	116 $\pm$ 21
	4	76 $\pm$ 9	100 $\pm$ 13
	1.5	67 $\pm$ 11	111 $\pm$ 6
	0.5	80 $\pm$ 7	112 <sup>***</sup>
C (-)*	-	85 $\pm$ 10	109 $\pm$ 7
C (+)**	-	362	232

<sup>a</sup>NR  $\pm$  DE: número promedio (n=2) de revertientes His+  $\pm$  desvío estándar. <sup>b</sup> SAM: Sin activación metabólica. <sup>c</sup> CAM: Con activación metabólica.

\*C(-): control negativo, dimetilsulfóxido (DMSO) 0,5%.

\*\*C(+): control positivo, 4-nitro-*o*-fenilendiamina (4NPD, 20  $\mu\text{g/placa}$ , 0 % S9), 2-aminofluoreno (2-AF, 10  $\mu\text{g/placa}$ , 5 % S9).

\*\*\* No se tiene el duplicado.

Se indica el número promedio de colonias revertientes His+ de la cepa TA100 de *S. typhimurium*, en ausencia (0 % S9) y en presencia de activación metabólica (5 % S9).

Tabla 6.8. Ensayo de Ames del potencial fármaco CH38 y de sus metabolitos S1 y S2.

Compuesto	Dosis ( $\mu\text{g/placa}$ )	NR $\pm$ DE <sup>a</sup>	
		SAM <sup>b</sup>	CAM <sup>c</sup>
CH38	400	2 $\pm$ 1 (Precipitación y toxicidad)	2 $\pm$ 1 (Precipitación)
	133	2 $\pm$ 0 (Precipitación)	3 $\pm$ 1
	44	5 $\pm$ 1	5 $\pm$ 1
	15	3 $\pm$ 1	4 $\pm$ 0
	5	1 $\pm$ 0	7 $\pm$ 1
S1	150	2 $\pm$ 1 (Toxicidad)	2 $\pm$ 1
	50	4 $\pm$ 2	7 $\pm$ 3
	17	4 $\pm$ 1	6 $\pm$ 1
	6	4 $\pm$ 0	4 $\pm$ 1
	2	3 $\pm$ 0	5 $\pm$ 0
S2	40	4 $\pm$ 2	4 $\pm$ 4
	13	5 $\pm$ 1	5 $\pm$ 1
	4	5 $\pm$ 1	3 $\pm$ 0
	1.5	6 $\pm$ 5	4 $\pm$ 1
	0.5	4 $\pm$ 1	3 $\pm$ 1
C (-)*	-	4 $\pm$ 1	3 $\pm$ 2
C (+)**	-	77	15

<sup>a</sup>NR  $\pm$  DE: número promedio (n=2) de revertientes His+  $\pm$  desvío estándar. <sup>b</sup> Sin activación metabólica. <sup>c</sup> Con activación metabólica.

\*(C-): control negativo, dimetilsulfóxido (DMSO).

\*\* (C+): control positivo, 4-nitro-*o*-fenilendiamina (4NPD, 20  $\mu\text{g/placa}$ , 0 % S9), 2-aminoantraceno (2-AA, 2.0  $\mu\text{g/placa}$ , 5 % S9).

Se indica el número promedio de colonias revertientes His+ de la cepa TA1537 de *S. typhimurium*, en ausencia (0 % S9) y en presencia de activación metabólica (5 % S9).

Tabla 6.9. Ensayo de Ames del potencial fármaco CH38 y de sus metabolitos S1 y S2.

Compuesto	Dosis ( $\mu\text{g/placa}$ )	NR $\pm$ DE <sup>a</sup>	
		SAM <sup>b</sup>	CAM <sup>c</sup>
CH38	400	234 $\pm$ 2 (Precipitación)	266 $\pm$ 11
	133	147 $\pm$ 45 (Precipitación)	270 $\pm$ 16 (Precipitación)
	44	241 $\pm$ 4 (Precipitación)	209 $\pm$ 7
	15	234 $\pm$ 16	216 $\pm$ 31
	5	232 $\pm$ 100	268 $\pm$ 23
S1	150	196 $\pm$ 34	206 $\pm$ 8
	50	254 $\pm$ 18	216 $\pm$ 21
	17	274 $\pm$ 7	232 $\pm$ 9
	6	259 $\pm$ 7	246 $\pm$ 6
	2	232 $\pm$ 24	276 $\pm$ 30
S2	40	214 $\pm$ 33	222 $\pm$ 10
	13	250 $\pm$ 6	237 $\pm$ 17
	4	249 $\pm$ 8	194 $\pm$ 13
	1.5	293 $\pm$ 27	227 $\pm$ 8
	0.5	308 $\pm$ 8	232 $\pm$ 24
C (-)*	-	270 $\pm$ 23	272 $\pm$ 22
C (+)**	-	366	323

<sup>a</sup>NR  $\pm$  DE: número promedio (n=2) de revertientes His+  $\pm$  desvío estándar. <sup>b</sup> SAM: Sin activación metabólica. <sup>c</sup> CAM: Con activación metabólica.

\*(C-): control negativo, dimetilsulfóxido (DMSO) 0,5%.

\*\* (C+): control positivo, azida de sodio (NAAZ, 2.0  $\mu\text{g/placa}$ , 0 % S9), 2-aminofluoreno (2-AF, 10  $\mu\text{g/placa}$ , 5 % S9).

Se indica el número promedio de colonias revertientes His+ de la cepa TA102 de *S. typhimurium*, en ausencia (0 % S9) y en presencia de activación metabólica (5 % S9).

**Tabla 6.10.** Ensayo de Ames del potencial fármaco CH38 y de sus metabolitos S1 y S2.

Compuesto	Dosis (µg/placa)	NR ± DE <sup>a</sup>	
		SAM <sup>b</sup>	CAM <sup>c</sup>
CH38	400	3±0 (Precipitación)	10±3 (Precipitación)
	133	11±2 (Precipitación)	9±2
	44	8±1(Precipitación, césped parcial)	14±4
	15	8±0	12±5
	5	6±1	14±1
S1	150	77±94	13±3
	50	10±2	9±3
	17	11±1	8±2
	6	9***	10±2
	2	10±1	12±4
S2	40	12±3	18±7
	13	8±8	13±1
	4	10±1	13±1
	1.5	7±1	11±2
	0.5	9±3	14±2
C (-)*	-	10±1	11±1
C (+)**	-	264	117

<sup>a</sup>NR ± DE: número promedio (n=2) de revertientes His+ ± desvío estándar. <sup>b</sup>SAM: Sin activación metabólica. <sup>c</sup>CAM Con activación metabólica.

\*(C-): control negativo, dimetilsulfóxido (DMSO) 0,5%.

\*\* (C+): control positivo, azida de sodio (NAAZ, 2.0 µg/placa, 0 % S9), 2-aminofluoreno (2-AF, 10 µg/placa, 5 % S9).

\*\*\* No se tiene el duplicado.

Se indica el número promedio de colonias revertientes His+ de la cepa TA1535 de *S. typhimurium*, en ausencia (0 % S9) y en presencia de activación metabólica (5 % S9).

En la Tabla 6.11 se muestra el resumen de los resultados de mutagenicidad de los compuestos evaluados, en las diferentes cepas, en presencia y en ausencia de activación metabólica.

**Tabla 6.11.** Compuestos CH38, S1 y S2 evaluados en cinco cepas de *S. typhimurium*, en ausencia (0% S9) y en presencia (5% S9) de activación metabólica. ✓: compuesto no mutagénico.

	TA 98	TA 100	TA 102	TA 1535	TA 1537
Compuesto	SAM	0% S9	0% S9	0% S9	0% S9
	CAM	5% S9	5% S9	5% S9	5% S9
CH38					
S1					
S2					

## 7. CONCLUSIONES

- Las técnicas de CCF y HPLC, permitieron identificar la formación de los principales metabolitos S1 y S2 obtenidos ante la metabolización del potencial fármaco CH38, a diferentes tiempos de incubación. Se identificaron otros dos metabolitos desconocidos denominados PD1 y PD2.
- El potencial fármaco CH38 es metabolizado principalmente por la fracción microsomal no tanto por la fracción citosólica. En los diferentes tiempos de metabolización, se observa la presencia de CH38 en casi un 100 % de concentración relativa, esto alude a que se metaboliza poco.
- Ninguno de los compuestos, la chalcona CH38 ni ninguno de los principales metabolitos, el sulfinil o sulfonil derivado, presentaron capacidad mutagénica en las cinco cepas de *S. typhimurium*, en el ensayo de Ames.

## 8. PERSPECTIVAS

- Estudio mediante HPLC de la metabolización *in vitro* del potencial fármaco CH38 por la fracción citosólica, a diferentes tiempos de incubación.
- Caracterización fisicoquímica (espectroscopías de infrarrojo y de RMN, espectrometría de masas) de los nuevos metabolitos identificados en los estudios de metabolización *in vitro*.
- Después de caracterizar y poder sintetizar los otros metabolitos, evaluar si poseen o no capacidad mutagénica mediante ensayo de Ames.

## *Conclusiones y Perspectivas*

- Realizar otros estudios preclínicos *in vitro* e *in vivo* (por ejemplo estudios de solubilidad, pasaje de barrera hematoencefálica, estabilidad en plasma, ensayos de toxicidad aguda, genotoxicidad, farmacocinética).

## 9. BIBLIOGRAFÍA

**Ames, B.N., Lee, F.D., Durston, W.E. (1973).** An improved bacterial test system for the detection and classification of mutagens and carcinogens. *Proc Natl Acad Sci USA*, 70(3):782-786.

**Armijo, J.A. (2008).** Ensayos clínicos, estudios de utilización de medicamentos y estudios farmacoeconómicos. En: *Farmacología Humana*, 5ª Ed., Flórez, J.; Armijo, J.A.; Mediavilla, Á. editores. Editorial Masson, S.A., Barcelona (España), pp. 229-246.

**Audet, J.N.; Soucy, G.; Julien, J.P. (2012).** Methylene blue administration fails to confer neuroprotection in two amyotrophic lateral sclerosis mouse models. *Neurosci*, 209:136-143.

**Barbeito, L.; Ganz, J.; Olivera, S.; Díaz-Amarilla, P. (2011).** Aislamiento y uso de un nuevo tipo de célula glial con potencial neurotóxico. UY33377 (A).

**Barbeito, A.G.; Martínez, L.; Vargas, M.R.; Pehar, M.; Mañay, N.; Beckman, J.S.; Barbeito, L.; Cassina, P. (2010).** Lead exposure stimulates VEGF expression in the spinal cord and extends survival in a mouse model of ALS. *Neurobiol Dis*, 37(3):574-580.

**Barbeito, L.H.; Pehar, M.; Cassina, P.; Vargas, M. R.; Peluffo, H.; Viera, L.; Estévez, A. G.; Beckman, J. S. (2004).** A role for astrocytes in motor neuron loss in amyotrophic lateral sclerosis. *Brain Res Rev*, 47(1-3):263-274.

**Boiani, M.; Merlino, A.; Gerpe, A.; Porcal, W.; Croce, F.; Depaula, S.; Rodríguez, M.A.; Cerecetto, H.; González M. (2009)** o-Nitroanilines as major metabolic products of anti-Trypanosoma cruzi 5-phenylethenylbenzofuroxans in microsomal and cytosolic fractions of rat hepatocytes and in whole parasitic cells. *Xenobiotica*, 39(3):236-4.

**Boillée, S.; Vande, C.; Cleveland, D.W. (2006).** ALS: A disease of motor neurons and their nonneuronal neighbors. *Neuron*, 52(1):39-59.

**Borrás, J.; Plaza, I.; Navarro, A.; Perís, J.; Antón, A. (1998).** Riluzol como tratamiento de la esclerosis lateral amiotrófica. *Rev Neurol*, 27:1021-1027.

**Brock. (2009).** Biología molecular de los microorganismos. Editorial Addison-Wesley, 12<sup>a</sup> Edición.

**Buxton, I.L. (2007).** Farmacocinética y farmacodinamia. Dinámica de la absorción, distribución, acción y eliminación de los fármacos. En: Goodman y Gilman. Las bases farmacológicas de la terapéutica, Brunton, L.L., Lazo, J.S., Parker, K.L. Undécima edición, McGrawHil, Interamericana, México, pp. 1-39.

**Cabrera, M. (2012).** Flavonoides y análogos como moduladores de enzimas detoxificantes de xenobióticos. Potenciales agentes quimiopreventivos para el cáncer. Tesis doctoral, Facultad de Química-UdelaR.

**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. (2010).** Identification of chalcones as in vivo liver monofunctional phase II enzymes inducers. *Bioorg Med Chem*, 18:5391-5399.

**Cabrera, M.; Simoens, M.; Falchi, G.; Lavaggi, M.L.; Piro, O.E.; Castellano, E.E.; Vidal, A.; Azqueta, A.; Monge, A.; López de Ceráin, A.; Sagrera, G.; Seoane, G.; Cerecetto, H.; González, M. (2007).** Synthetic chalcones, flavanones and flavones as antitumoral agents: biological evaluation and structure-activity relationships. *Bioorg Med Chem*, 15(10):3356-3367.

**Champelovier, P.; Chauchet, X.; Hazane-Puch, F.; Vergnaud, S.; Garrel, C.; Laporte, F.; Boutonnat, J.; Boumendjel, A. (2013).** Cellular and molecular mechanisms activating the cell death processes by chalcones: Critical structural effects. *Toxicol In Vitro*, 27(8):2305-2315.

**Chu, K.C., Patel, K.M., Lin, A.H., Tarone, R.E., Linhart, M.S., Dunkel, V.C. (1981).** Evaluating statistical analysis and reproducibility of microbial mutagenicity assays. *Mut Res* 85, 119-132.

**Collado-Vázquez, S., Carrillo, J.M. (2014).** La esclerosis lateral amiotrófica en la literatura, el cine y la televisión. *Rev Neurol*, 59 (1):37-44.

**Czczot, H.; Tudek, B.; Kusztelak, J; Szymczyk, T.; Dobrowolska, B.; Glinkowska, G.; Malinowski, J.; Strzelecka, H. (1990).** Isolation and studies of the mutagenic activity in the Ames test of flavonoids naturally occurring in medical herbs. *Mutat Res*, 240(3):209-216.

**De Miguel, M.; Garcia, C.; Martin, L.; Escribano, M. (2012).** Guía de desarrollos preclínicos, Genoma España, p. 1-80.

**Del Arco, C.; Flórez, J. (2008).** Metabolismo de los fármacos. En: *Farmacología Humana*, 5ª Ed. Flórez, J.; Armijo, J.A.; Mediavilla, Á. editores. Editorial Masson, S.A., Barcelona (España), pp. 87-100.

**Díaz-Amarilla, P. (en curso).** Astrocitos y esclerosis lateral amiotrófica. Tesis doctoral, PEDECIBA Biología, UdelaR.

**Díaz-Amarilla, P.; Olivera-Bravo, S.; Trias, E.; Cragolini, A.; Martínez-Palma, L.; Cassina, P.; Beckman, J.; Barbeito, L. (2011).** Phenotypically aberrant astrocytes that promote motoneuron damage in a model of inherited amyotrophic lateral sclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 108:18126-18131.

**Donato, M.T.; O'Connor, J.E. (2012).** Métodos de evaluación del citocromo P-450 y de su papel en el metabolismo de fármacos. En: *Monografías de la Real Academia Nacional de Farmacia*, Monografía XIV. Citocromo P450, p. 313-359.

**Engida, A.M.; Kasim, N.S.; Tsigie, Y.A.; Ismadji, S.; Huynh, L.H.; Ju, Y.H. (2013).** Extraction, identification and quantitative HPLC analysis of flavonoids from sarang semut (*Myrmecodia pendan*). *Ind Crop Prod*, 41:392-396.

**Esquerda, J. (2005).** Esclerosis lateral amiotrófica. *Mente y cerebro*, 1-11.

**Fallas, M. (2010).** Esclerosis lateral amiotrófica. *Rev Med Costa Rica Centroamérica*, 591: 89-92.

**Fernández, S.I.; Alfonso, J.L.; Acosta, P.C. (2006).** *In vitro* mutagenic evaluation of policosanol. *Rev CENIC Ciencias Biológicas*, 37(1):9-12.

**Flórez, J. (2008).** Farmacocinética: absorción, distribución y eliminación de los fármacos. En: Farmacología humana, Flórez, J., Armijo, J.A., Mediavilla, A., editores, 5ª edición, pp. 57-85. Elsevier Masson, Barcelona.

**Gabay, M., Cabrera M., Maio R.D., Paéz, J.A., Campillo, N., Lavaggi, M. L., Cerecetto, H., González, M. (2014).** Mutagenicity of *N*-oxide containing heterocycles and related compounds: experimental and theoretical studies. *Curr Top Med Chem*, 14(11): 1374-87.

**Gámez, R.; Más, R. (2007).** Aspectos generales de los estudios toxicológicos preclínicos más empleados. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, 38(3): 204-208.

**Gandelman, M.; Peluffo, H.; Beckman, J.S.; Cassina, P.; Barbeito, L. (2010).** Extracellular ATP and the P2X7receptor in astrocyte-mediated motor neuron death: implications for amyotrophic lateral sclerosis. *J Neuroinflamm*, 7:1-9.

**García, S.; Heinzen, H.; Martínez, R.; Moyna, P. (1993).** Identification of flavonoids by TLC scanning analysis. *Chromatographia*, 35(7-8):430-434.

**Gil, A.G.; López de Cerain, A. (2012).** Estudios preclínicos en el desarrollo de agentes anti-*T. cruzi*. Estudios de toxicidad. En: Enfermedad de Chagas: Estrategias en la búsqueda de nuevos medicamentos. Una visión iberoamericana. Red Iberoamericana de Investigación, Desarrollo e Innovación de medicamentos anti-Chagas (RIDIMEDCHAG-CYTED). Editores: Cerecetto, H.; González, M., Editorial Silanes S.V. p. 341-364.

**González, F.J.; Tukey, R.H. (2007).** Metabolismo de fármacos. En: Goodman y Gilman. Las bases farmacológicas de la terapéutica, Brunton, L.L., Lazo, J.S., Parker, K.L. Undécima edición, McGrawHil, Interamericana, México pp. 71-91.

**Gordon, P.H. (2013).** Amyotrophic lateral sclerosis: an update for 2013 clinical features, pathophysiology, management and therapeutic trials. *Aging Dis*, 4(5):295-310.

- Grosa, G.; Galli, U.; Rolando, B.; Fruttero, R.; Gervasio, G.; Gasco, A. (2004).** Identification of 2,3-diaminophenazine and of o-benzoquinone dioxime as the major *in vitro* metabolites of benzofuroxan. *Xenobiotica*, 34(4):345-352.
- Hayes, J.D.; Flanagan, J.U.; Jowsey, I.R. (2005).** Glutathione transferases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 45:51-88.
- Hijova, E. (2006).** Bioavailability of chalcones. *Bratisl Lek Listy*, 107(3):80-84.
- Hughes, J.P.; Rees, S; Kalindjian, S.B.; Philpott, K.L. (2011).** Principles of early drug discovery. *Br J Pharmacol*, 162(6):1239-1249.
- Jiang, Z.Q.; Chen, C.; Yang, B.; Hebbar, V.; Kong, A.N. (2003).** Differential responses from seven mammalian cell lines to the treatments of detoxifying enzyme inducers. *Life Sci*, 72(20):2243-2253.
- Kachadourian, R.; Day, B.J.; Pugazhenti, S.; Franklin, C.C.; Genoux-Bastide, E.; Mahaffey, G.; Gauthier, C.; Di Pietro, A.; Boumendjel, A. (2012).** A synthetic chalcone as a potent inducer of glutathione biosynthesis. *J Med Chem*, 55(3):1382-1388.
- Kerns, E.H.; Di, L. (2008 a).** Metabolic stability methods. En: *Drug-like properties: concepts, structure design and methods from ADME to toxicity optimization*, Kerns, E.H.; Di, L., 1st ed., Academic Press, USA, pp. 329-346.
- Kerns, E.H.; Di, L. (2008 b).** Barriers to drug exposure in living systems. En: *Drug-like properties: concepts, structure design and methods from ADME to toxicity optimization*, Kerns, E.H.; Di, L., 1st ed., Academic Press, USA, pp. 17-33.
- Kerns, E.H.; Di, L. (2008 c).** Metabolic stability. En: *Drug-like properties: concepts, structure design and methods from ADME to toxicity optimization*, Kerns, E.H.; Di, L., 1st ed., Academic Press, USA, pp. 137-167.
- Kerns, E.H.; Di, L. (2008 d).** Advantages of good drug-like properties. En: *Drug-like properties: concepts, structure design and methods from ADME to toxicity optimization*, Kerns, E.H.; Di, L., 1st ed., Academic Press, USA, pp. 6-16.

**Korc, I.; Fogel, E. (2000).** Toxicocinética. En: Patología Toxicológica. De Fogel, E. pp. 27-47.

**Kumar, S.K.; Hager, E.; Pettit, C.; Gurulingappa, H.; Davidson, N.E.; Khan, S.R. (2003).** Design, synthesis, and evaluation of novel boronic-chalcone derivatives as antitumor agents. *J Med Chem*, 46(14):2813-2815.

**Lee, Ch.; Chiu, Y.W.; Wang, K.C.; Hwang, C.S.; Lin, K.H.; Lee, I.T.; Tsai, C.P. (2013).** Riluzole and prognostic factors in amyotrophic lateral sclerosis long-term and short-term survival: a population-based study of 1149 cases in Taiwan. *J Epidemiol*, 23(1):35-40.

**Lin, W.; Wu, R.T.; Wu, T.; Khor, T.O.; Wang, H.; Kong, A.N. (2008).** Sulforaphane suppressed LPS-induced inflammation in mouse peritoneal macrophages through Nfr2 dependent pathway. *Biochem Pharmacol*, 76(8):967-973.

**Linares, E.; Seixas, L.V.; dos Prazeres, J.N.; Ladd, F.V.; Ladd, A.A.; Coppi, A.A.; Augusto, O. (2013).** Tempol moderately extends survival in a hSOD1 (G93A) ALS rat model by inhibiting neuronal cell loss, oxidative damage and levels of non-native hSOD1 (G93A) forms. *Plos One*, 8(2):1-12.

**Liu, J.; Lillo, C.; Jonsson, P.A.; Vande-Velde, C.; Ward, C.M.; Miller, T.M.; Subramaniam, J.R.; Rothstein, J.D.; Andersen, P.M.; Brännström, T.; Gredal, O.; Wong, P.C.; Williams, D.S.; Cleveland, D.W. (2004).** Toxicity of familial ALS-linked SOD1 mutants from selective recruitment to spinal mitochondria. *Neuron*, 43(1):5-17.

**Mancuso, R.; Oliván, S.; Rando, A.; Casas, C.; Osta, R.; Navarro, X. (2012).** Sigma-1R agonist improves motor function and motoneuron survival in ALS mice. *Neurotherapeutics*, 9(4):814-826.

**Maron, D.M.; Ames, B.N. (1983).** Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutat Res*, 113(3-4):173-215.

**Martin, L.J. (2010).** Olesoxime, a cholesterol-like neuroprotectant for the potential treatment of amyotrophic lateral sclerosis. *IDrugs*, 13(8):568-580.

**Miquel, E.; Cassina, A.; Martinez, L.; Bolatto, C.; Trías, E.; Gandelman, M.; Radi, R.; Barbeito, L.; Cassina, P. (2012).** Modulation of astrocytic mitochondrial function by dichloroacetate improves survival and motor performance in inherited amyotrophic lateral sclerosis. *Plos One*, 7(4):1-9.

**Mortelmans, K.; Zeiger, E. (2000).** The Ames Salmonella/microsome mutagenicity assay. *Mutat Res*, 455(1-2): 29-60.

**Niwa, J.; Ishigaki, S.; Hishikawa, N.; Yamamoto, M.; Doyu, M.; Murata, S.; Tanaka, K.; Taniguchi, N.; Sobue, G. (2002).** Dorfin ubiquitylates mutant SOD1 and prevents mutant SOD1-mediated neurotoxicity. *J Biol Chem*, 277(39):36793-36798.

**OECD, Guidelines for the testing of chemicals. (1997).** Bacterial reverse mutation, test N° 471.

**Orient, F.; Terré, R.; Guevara, D.; Bernabeu, M. (2006).** Tratamiento neurorrehabilitador de la esclerosis lateral amiotrófica. *Rev Neurol*, 43(9):549-555.

**Pedregal, C. y Avendaño, C. (2001).** Los métodos espectroscópicos en el análisis de fármacos. En: Introducción a la Química Farmacéutica, C. Avendaño 2da. Edición, Interamericana-McGraw-Hill, España, pp. 863-896.

**Prida, J. (2009).** Esclerosis lateral amiotrófica: una actualización. *Rev Mex Neuroci*, 10(4):281-286.

**Ren, W.; Qiao, Z.; Wang, H.; Zhu, L.; Zhang, L. (2003).** Flavonoids: promising anticancer agents. *Med Res Rev*, 23(4):519-534.

**Resende, F.A.; Vilegas, W.; dos Santos, L.C.; Varanda, E.A. (2012).** Mutagenicity of flavonoids assayed by bacterial reverse mutation (Ames) test. *Molecules*, 17(5):5255-5268.

**Ripps, M.E.; Huntley, G.W.; Hof, P.R.; Morrison, J.H.; Gordon, J.W. (1995).** Transgenic mice expressing an altered murine superoxide dismutase gene provide an animal model of amyotrophic lateral sclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 92(3):689-693.

**Robberecht, W.; Van Den Bosch, L.; Vleminckx, V. (2000).** Amyotrophic lateral sclerosis: pathogenesis. *Acta Neurol Belg*, 100(3):181-187.

**Rowland, L.P.; Shneider, N.A. (2001).** Amyotrophic lateral sclerosis. *N Engl J Med*, 344(22):1688-1700.

**Ruddy, D.M.; Parton, M.J.; Al, A.; Lewis, C.M.; Vance, C.; Smith, B.N.; Leigh, P.N.; Powell, J.F.; Siddique, T.; Meyjes, E.P.; Baas, F.; de Jong, V.; Shaw, C.E. (2003).** Two families with familial amyotrophic lateral sclerosis are linked to a novel locus on chromosome 16 q. *Am J Hum Genet*, 73(2):390-396.

**Sandoval, A.M. (2008).** Ensayo de mutagenicidad con la bacteria *Salmonella typhimurium*. Prueba de Ames. En: Ensayos toxicológicos para la evaluación de sustancias químicas en agua y suelo. La experiencia en México. Ramírez, P., Mendoza-Cantú, A., 1ra edición, México, pp. 319-344.

**Shi, J.; Karlsson, H.L.; Johansson, K.; Gogvadze, V.; Xiao, L.; Li, J.; Burks, T.; Bennett, A.; Uheida, A.; Muhammed, M.; Mathur, S.; Morgenstern, R.; Kagan, V.E.; Fadeel, B. (2012).** Microsomal glutathione transferase 1 protects against toxicity induced by silica nanoparticles but not by zinc oxide nanoparticles. *ACS Nano*, 6(3):1925-1938.

**Stocks, M. (2013).** The small molecule drug discovery process-from target selection to candidate selection. Introduction to Biological and Small Molecule Drug Research and Development. Theory and Case Studies, Editorial Elsevier, pp 81-126.

**Trojsi, F.; Monsurró, M.R.; Tedeschi, G. (2013).** Exposure to environmental toxicants and pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis: state of the art and research perspectives. *Int J Mol Sci*, 14:15286-15311.

**Trossero, C.; Caffarena, G.; Hure, E.; Rizzotto, M. (2006).** Detección de mutagenicidad en compuestos N-Nitroso con el test de ames. *Acta Farm Bonaerense*, 25(1):139-44.

**Vargas, M.R.; Pehar, M.; Cassina, P.; Beckman, J.S.; Barbeito, L. (2006).** Increased glutathione biosynthesis by Nrf2 activation in astrocytes prevents p75NTR dependent motor neuron apoptosis. *J Neurochem*, 97:687-696.

**Vela, A.; Galán, L.; Valencia, C.; de la Torre, P.; Cuadrado, M.L.; Esteban, J.; Guerrero, A.; García, A.; Matías, J. (2012).** Mutación SOD1-N19S en una familia de esclerosis lateral amiotrófica. *Neurología*, 27(1):11-15.

**Venkatachalam, H.; Nayak, Y.; Jayashree, B.S. (2012).** Synthesis, characterization and antioxidant activities of synthetic chalcones and flavones. *APCBEE Procedia*, 3:209-213.

**Venkova, K.; Christov, A.; Kamaluddin, Z.; Kobalka, P.; Hensley, K. (2012).** Progress in therapy development for amyotrophic lateral sclerosis. *Neurol Res Int*, 1-9.

**Williams, D.A. (2008).** Thiol methylation. En: Foye's principles of medicinal chemistry, sixth edition, Lemke, T.L., Williams, D.A., USA, pp. 293-294.

**Yoshihara, T.; Ishigaki, S.; Yamamoto, M.; Liang, Y.; Niwa, J.; Takeuchi, H.; Doyu, M.; Sobue, G. (2002).** Differential expression of inflammation and apoptosis related genes in spinal cords of a mutant SOD1 transgenic mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem*, 80(1):158-167.

**Zaragoza, F. (2012 a).** Thiols. En: Lead Optimization for Medicinal Chemists: Pharmacokinetic Properties of Functional Groups and Organic Compounds, First Edition, editorial Wiley-VCH, Germany, pp. 98-99.

**Zaragoza, F. (2012 b).** Thioethers. En: Lead Optimization for Medicinal Chemists: Pharmacokinetic Properties of Functional Groups and Organic Compounds, First Edition, editorial Wiley-VCH, Germany, pp. 100-103.

## 10. ANEXO

### 10.1. Preparación de soluciones stock para el ensayo de metabolización

Buffer fosfato (0.1 M, 1.5 mM EDTA, pH 7.4), agua destilada (50 mL).

NADP<sup>+</sup> (40 mM) en amortiguador fosfato (1 mL).

Glucosa-6-fosfato (350 mM) en amortiguador fosfato (1 mL).

Glucosa-6-fosfatodeshidrogenasa (50 U/mL) en amortiguador fosfato (100 µL).

Producto (40 mM) en DMSO (1 mL).

MgCl<sub>2</sub> (130 mM) en agua destilada (1 mL).

### 10.2. Ensayo de Ames

#### 10.2.1. Cultivo bacteriano

Se emplea una concentración de  $2 \times 10^9$  bacterias/mL. Se prepara el cultivo líquido sembrando una colonia aislada procedente de una placa máster o añadiendo el contenido de un criotubo (100 µL) en medio Oxoid N°2 (30 mL). Se deja incubar por 12 h a 37°C.

#### 10.2.2. Medio mínimo selectivo para revertientes His<sup>+</sup>

Se disuelven las sales K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (7.0 g/L), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (2.0 g/L), (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1.0 g/L), C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>Na<sub>3</sub>·2H<sub>2</sub>O (0.25 g/L) en agua mili-Q (200 mL). El Bacto Agar (15 g/L) se disuelve en agua mili-Q (800 mL). Ambas soluciones se esterilizan en autoclave. Se añaden MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (10 mL) y glucosa (10 mL) a las sales y se mezcla esta preparación con el agar. Repartir en placas de Petri.

#### 10.2.3. Solución de MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O

Disolver MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (1.0 g/L) en agua mili-Q (100 mL) y esterilizar en autoclave.

#### 10.2.4. Solución de Glucosa

Disolver D(+)-glucosa (20 g) en agua mili-Q (100 mL). Esterilizar con filtro Millipore de 0.22 µm de diámetro.

#### 10.2.5. Medio de cultivo Oxoid N°2

Se prepara el medio sólido mezclando el medio de cultivo Oxoid N°2 (5.0 g) y el Bacto Agar (3.0 g) con agua mili-Q (200 mL). Esterilizar en autoclave y repartir en placas de Petri.

Se prepara el medio nutritivo líquido mezclando el medio de cultivo Oxoid N°2 (5.0 g) con agua mili-Q (200 mL). Esterilizar en autoclave.

#### **10.2.6. Agar**

Disolver NaCl (1.0 g) y Bacto Agar (1.2 g) en agua mili-Q (200 mL). Esterilizar en autoclave.

#### **10.2.7. Agar para el ensayo de Ames**

Añadir una solución de 0.5 mM histidina/0.5 mM biotina (10 mL) cada 100 mL de agar. En el ensayo de toxicidad se utiliza una solución de 100 mM histidina/0.5 mM biotina.

#### **10.2.8. Amortiguador fosfato para Ames**

Disolver NaCl (8.0 g), KCl (0.2 g), Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (1.15 g), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0.2 g) en agua mili-Q (100 mL) Esterilizar en autoclave.

#### **10.2.9. Mezcla S9**

Añadir agua mili-Q (9.625 mL), amortiguador fosfato (0.1 M, pH 7.4, 12.5 mL), solución salina (0.5 mL), NADP<sup>+</sup>(1.0 mL), D-glucosa-6-fosfato (0.125 mL), fracción S9 (5% v/v, 1.25 mL), para alcanzar un volumen total de 25 mL.

#### **10.3.10. Soluciones de histidina/biotina**

La solución para el ensayo de toxicidad (contiene mayor concentración de histidina) se prepara disolviendo histidina (2.1 g) y biotina (12.21 mg) en agua mili-Q (100 mL). La solución para el ensayo de Ames (contiene baja concentración de histidina) se prepara disolviendo histidina (10.48 mg) y de biotina (12.21 mg) en agua mili-Q (100 mL).

Esterilizar con filtro Millipore de 0.22 µm de diámetro.

La preparación del cultivo bacteriano, de la mezcla S9, del producto y la primera parte del ensayo (hasta que los tubos con las soluciones pasan a la estufa para su incubación) se realizó en condiciones de esterilidad (cabina de flujo laminar y material estéril). El material se descontaminó con hipoclorito de sodio durante 24 h.