



Licenciatura en Bioquímica

Facultad de Ciencias

Universidad de la República

Estudios preclínicos del flavonoide sintético CH38 con potencial uso para el tratamiento de la esclerosis lateral amiotrófica (ELA)

Tesina de grado

Bachiller: Gabriel Otero

Tutor: Mauricio Cabrera

Co-tutor: Pablo Díaz-Amarilla

Laboratorio de Neurobiología Celular y Molecular

Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable

Grupo de Química Medicinal

Facultad de Ciencias

Agradecimientos

A Mauricio y Pablo por haberme brindado la oportunidad, el conocimiento y la motivación para realizar este trabajo.

A mis padres Fernando y Elizabeth por apoyarme en todo momento de mi vida.

A mis amigos de la facultad: Alejandro, Camila, Florencia, Ignacio, Mercedes y Noé. Quienes han sido parte fundamental de este proceso que comenzó hace cuatro años atrás.

A mi abuela Marta quién siempre ha velado por mi educación.

A los compañeros del Grupo de Química Medicinal.

A Silvia y Eugenia del Laboratorio de Neurobiología Celular y Molecular, IIBCE.

A Laura Celano, Marcelo Femamdez, Joel Gonzalez y Emiliano Trias por la ayuda brindada.

A Pablo Cabral por corregir este trabajo

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

Índice

Resumen	5
Abreviaturas	7
Introducción.....	9
Proceso de desarrollo de nuevos fármacos.....	10
1. Identificación y validación de dianas	10
2. Detección de “hits”	10
3. Optimización de cabezas de serie	10
4. Primeros estudios de seguridad y eficacia clínica	10
5. Ensayos PoC/Fase I.....	10
6. Ensayos de Fase II.....	10
7. Ensayos de Fase III.....	11
8. Registro	11
9. Actividades posteriores al lanzamiento	11
Ensayos preclínicos.....	11
Generalidades de los Flavonoides.....	13
Propiedades terapéuticas de los flavonoides	14
Antioxidantes	14
Inhibición de enzimas	15
Actividad anti-inflamatoria	15
Actividad sobre el SNC	16
Esclerosis Lateral Amiotrófica.....	16
Papel de los astrocitos en el SNC.....	17
Modelo animal y nuevos partícipes en la progresión de la enfermedad	18
Actualidad farmacológica para el tratamiento de la ELA	20
Búsqueda de una estrategia farmacológica para eliminar selectivamente las células AbA.....	21
Materiales y métodos.....	24
Solubilidad: método turbidimétrico.	25
Determinación del Log P	25

Permeabilidad de Barrera Hematoencefálica (BHE)	26
Unión a seroalbúmina humana (SAH).....	26
Ensayo de toxicidad oral aguda.....	27
Evaluación del potencial terapéutico CH38 en un modelo animal de ELA	28
Modelo animal	28
Principios de la PCR.....	28
Genotipado por PCR	29
Electroforesis en gel de poliacrilamida	31
Análisis de la PCR.....	32
Tratamiento con CH38 <i>in vivo</i>	33
Objetivos	34
Objetivo general	35
Objetivos específicos	35
Resultados y discusión	36
CH38 presenta una baja solubilidad en disolventes acuosos.	37
CH38 es un compuesto de carácter mayoritariamente liposoluble	39
CH38 es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica.....	41
CH38 presenta un alto porcentaje de unión a seroalbúmina humana (SAH)	42
CH38 muestra baja toxicidad aguda	42
La administración de CH38 mostró una leve tendencia protectora en el modelo animal de ELA.	43
Conclusiones y perspectivas	45
Referencias.....	47
.....	47

Resumen

Recientemente se ha demostrado que un subtipo de astrocitos denominados células AbA (del inglés *Aberrant Astrocyte*) juega un papel importante en la muerte de motoneuronas espinales que tiene lugar en la Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA). Por lo que, una estrategia terapéutica propuesta para esta patología puede ser la eliminación selectiva de estas células que se ha demostrado que están estrechamente relacionadas a la fase sintomática de la enfermedad. En este contexto se estudió la actividad citotóxica selectiva hacia las células AbAs de compuestos pertenecientes a una quimioteca propia, lográndose identificar una serie de estructuras líderes entre los que encuentra el flavonoide sintético CH38.

El compuesto CH38 fue el que mostró la mayor actividad citotóxica selectiva hacia las AbAs lo que ameritó realizar estudios preclínicos de dicho compuesto como potencial fármaco para el tratamiento de la ELA. Además estudios previos han demostrado que CH38 es capaz de inducir la vía Nrf-2-ARE y es ampliamente sabido que activar esta vía en el Sistema Nervioso Central brinda un ambiente citoprotector en diversas patologías neurodegenerativas. Otro aspecto para resaltar es que CH38 no resultó mutagénico en ninguna de las condiciones exigidas por las guías OECD utilizando el test de Ames.

Con estas premisas, en este trabajo profundizamos en el desarrollo preclínico de CH38, involucrando estudios de propiedades fisicoquímicas como solubilidad, lipofilicidad, permeabilidad y toxicidad. Finalmente se estudió el potencial terapéutico de CH38 en el modelo animal de ELA, ratas SOD1^{G93A} obteniéndose resultados auspiciosos que merecen ser profundizados.

Abreviaturas

AgNO₃ - Nitrato de plata

AbA - acrónimo del inglés *aberrant astrocyte*

ADN - Ácido desoxiribonucleico

AINE - Antiinflamatorio no esteroideo

APS - Persulfato de amonio

BHE- Barrera hematoencefálica

CH38- Flavonoide sintético

DMSO - Dimetil sulfóxido

ELA - Esclerosis lateral amiotrófica

HPLC - acrónimo del inglés *Hight performance liquid chromatography*

LD50 - Dosis letal cincuenta

Log P - Coeficiente de partición octanol- PBS

NaOH - Hidróxido de sodio

Nrf-2 - acrónimo del inglés *NF-E2 related factors*

PBS - Buffer fosfato

PCR - acrónimo del inglés *Polymerase chain reaction*

PGHS - Enzima Prostaglandina endoperóxido sintetasa

SAH - Seroalbúmina humana

SNC - Sistema Nervioso Central

SOD1^{G93A} - Transgen de la proteína superóxido dismutasa 1 humana mutada

TBE - Buffer formado por Tris, Borato y EDTA

TEMED - Tetrametiletilendiamina

UV-Vis - Espectroscopia ultravioleta- visible

wt - acrónimo del inglés *Wild type*

Introducción

Proceso de desarrollo de nuevos fármacos

El desarrollo de nuevas terapias y/o nuevos fármacos es un proceso largo que usualmente dura entre 10 y 15 años, en promedio solo una de cada cinco mil moléculas llega a ser un medicamento registrado.

En la **Figura 1** se resumen las etapas que debe atravesar un compuesto para lograr convertirse en un fármaco comercial¹, a continuación se describen brevemente estas etapas:



Figura 1. Etapas de desarrollo de un fármaco

- 1. Identificación y validación de dianas:** Durante esta etapa se busca identificar nuevos blancos terapéuticos y confirmar su papel en el proceso patológico
- 2. Detección de “hits”:** Consiste en la realización de ensayos robustos que permitan detectar el potencial terapéutico de moléculas líderes.
- 3. Optimización de cabezas de serie:** Luego de identificados los líderes se los modifica químicamente para mejorar sus propiedades como fármaco.
- 4. Primeros estudios de seguridad y eficacia clínica:** Para determinar el perfil inicial de seguridad de un fármaco se efectúan análisis toxicológicos y farmacológicos de seguridad, utilizándose ensayos *in silico*, *in vitro* e *in vivo*.
- 5. Ensayos PoC/Fase I:** El fármaco es administrado por primera vez en humanos para verificar la tolerancia, mecanismo de acción y eficacia. En la mayoría de los casos el fármaco se prueba en un grupo pequeño de individuos sanos.
- 6. Ensayos de Fase II:** El principal objetivo es establecer el margen de dosis del nuevo fármaco a partir del conocimiento de su farmacocinética (absorción, distribución, metabolización y excreción) y su farmacodinamia

(naturaleza de la acción farmacológica y relación dosis/respuesta). Se realizan en pacientes potenciales pero también pueden llevarse en voluntarios sanos, el grupo tratado es de mayor número de personas que en los estudios de fase I.

7. **Ensayos de Fase III:** El objetivo principal es establecer una relación beneficio/riesgo en comparación con otras alternativas terapéuticas disponibles, establecer la eficacia del fármaco e identificar y cuantificar efectos indeseados más frecuentes.
8. **Registro:** En esta etapa se recopilan todos los estudios preclínicos y clínicos, los datos de calidad y descripción del proceso de fabricación; estos son presentados a las autoridades reguladoras las cuales autorizarán o no la comercialización del fármaco.
9. **Actividades posteriores al lanzamiento:** Una vez en el mercado, es necesario continuar evaluando algunas propiedades que no pueden ser fácilmente descritas en las etapas anteriores, es por esto que surge el concepto de farmacovigilancia, para evaluar posibles nuevas indicaciones, eficacia en combinación con otros fármacos y la eficacia en las condiciones habituales de uso.

Cabe aclarar que los ensayos de carácter preclínico realizados en este trabajo, se encuentran enmarcados dentro de la etapa 4, por lo tanto solo se profundizará en conceptos pertenecientes a dicha etapa.

Ensayos preclínicos

En los últimos años, múltiples propiedades de los candidatos a fármacos han sido optimizadas. Esto se debe a que en los tiempos recientes no solo es necesario que el fármaco tenga la actividad farmacológica deseada, también debe presentar propiedades ADME/Tox (**A**bsorción, **D**istribución, **M**etabolismo, **E**liminación y **T**oxicidad) lo suficientemente satisfactorias para priorizar el bienestar de los pacientes y la correcta eficacia del tratamiento.

De cientos de candidatos a fármacos que presentan interacción con el blanco terapéutico deseado, solo una pequeña fracción de éstos presenta propiedades ADME/Tox satisfactorias como para convertirse en fármaco. Lo que ha impulsado el diseño racional

de los mismos. El conocimiento de este tipo de propiedades ha ayudado a optimizar protocolos para determinar otras propiedades las cuales pueden verse afectadas. Un claro ejemplo de esto es estudiar cómo afecta la baja solubilidad, la inestabilidad química y la baja permeabilidad de un compuesto a los parámetros farmacocinéticos y a la biodistribución en ensayos *in vivo*².

Los ensayos preclínicos, están orientados a determinar todas estas propiedades, las cuales resultan muy importantes a la hora de seleccionar compuestos como futuros fármacos. Actualmente existe una tendencia a realizar tempranamente este tipo de ensayos, lo que permite ahorrar tiempos a futuro. A continuación, en la **Tabla 1** se presenta una lista con algunas de estas propiedades.

Estructurales	Fisicoquímicas	Bioquímicas	Farmacocinética y toxicidad
Lipofilicidad	Solubilidad	Metabolismo (fases I y II)	<i>Clearance</i>
Peso molecular (PM)	Estabilidad Química	Unión tejido específica y a proteínas	Vida media
pKa	Permeabilidad	Transporte (eflujo, difusión)	Biodisponibilidad
Reactividad			Interacciones fármaco-fármaco
Área de superficie polar (del inglés PSA.)			LD50

Tabla 1. Clasificación de propiedades determinadas mediante ensayos preclínicos

Estas propiedades están estrechamente relacionadas, por ejemplo cuando las propiedades estructurales interactúan con el ambiente físico, obtenemos las propiedades fisicoquímicas. Cuando las propiedades estructurales interactúan con proteínas, el resultado son las propiedades bioquímicas; a un nivel de complejidad mayor, cuando combinamos las propiedades bioquímicas con las fisicoquímicas, el resultado son las propiedades farmacocinéticas.

Por otro lado, para que un candidato a fármaco continúe su trayectoria e ingrese a una fase de estudios clínicos, es necesario que sea aprobado por la FDA (*Food and Drug Administration, EEUU*), la cual exige determinados requisitos para poder abordar las siguientes fases del desarrollo de un fármaco. Una vez que se cumple con todos los requisitos de la FDA estos candidatos pueden ser utilizados en la clínica.

La industria farmacéutica ha optado por anticiparse a estos requerimientos (realización de ensayos preclínicos) buscando promover únicamente el desarrollo de aquellos candidatos que tengan grandes probabilidades de éxito.

Las propiedades fisicoquímicas y bioquímicas de potenciales fármacos, como solubilidad, permeabilidad y estabilidad metabólica, han sido el foco temprano de la industria farmacéutica ya que estas permiten obtener un *background* general de los candidatos. Esto se debe a que dichas propiedades pueden determinarse relativamente rápido utilizando modelos biológicos en modelos *in vitro*. Esto ha ayudado a los químicos a decidir cómo modificar estructuras moleculares con el objetivo de mejorar las propiedades anteriormente mencionadas. Para enfatizar la importancia que han tenido los estudios preliminares *in vitro* en la búsqueda de nuevos fármacos, basta con mencionar que la probabilidad que un candidato a fármaco falle en alguna de las propiedades que se evalúan ha disminuido de un 39% en 1998 a un 10% en el año 2000³.

Generalidades de los Flavonoides

Los flavonoides comprenden un amplio grupo de compuestos orgánicos que fueron descritos por primera como metabolitos secundarios en las plantas. Debido a su gran diversidad se los ha involucrado en numerosas funciones como en el color púrpura de las flores, la protección UV-B y protección antimicótica⁴. Posteriormente se ha logrado desarrollar análogos sintéticos de flavonoides naturales.

La estructura general de los flavonoides, puede ser considerada como fenilbenzo-pironas (fenilcromonas), compuestos de dos anillos bencénicos unidos mediante un anillo heterocíclico pirano o pirona.

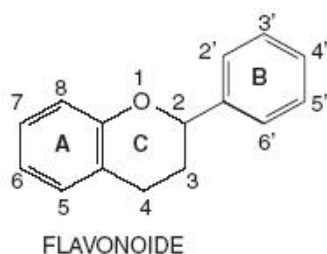


Figura 2. Estructura general de los flavonoides, considerados como fenilbenzo-pironas compuestos de dos anillos bencénicos (anillos A y B) unidos mediante un anillo heterocíclico de pirano o pirona (anillo C).

La diversidad estructural permitió clasificarlos en distintos grupos, como flavonas, isoflavonas, chalconas, flavonoles y flavanonas (**Figura 3**). También se han agrupado de acuerdo a los sustituyentes presentes en las tres estructuras cíclicas.

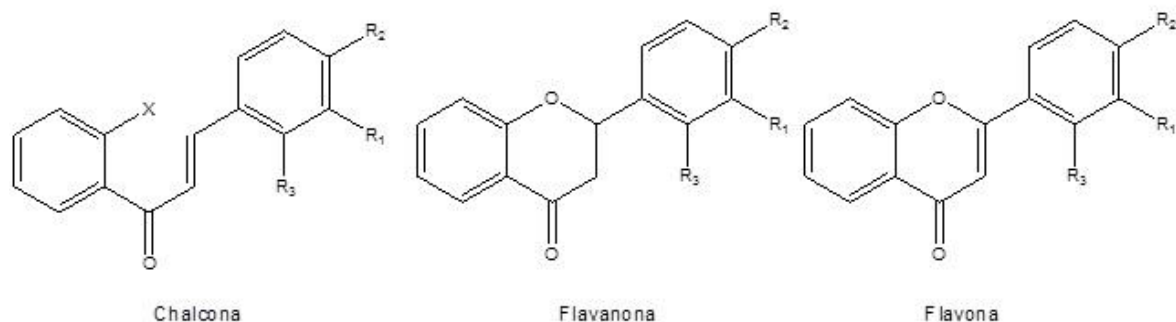


Figura 3. Estructura general de las chalconas, flavanonas y flavonas.

Propiedades terapéuticas de los flavonoides

Los flavonoides tanto naturales como sintéticos son moléculas versátiles capaces de modular una amplísima gama de actividades biológicas. Esto se ha reflejado en numerosas revisiones, que citan su actividad como antioxidantes, antibióticas, antiinflamatorias, moduladoras enzimáticas, antiproliferativos, estrogénicos, antivirales, osteogénicos, entre otras⁴⁻⁶. Esta amplitud desplegada de actividades biológicas obedece a pequeños cambios estructurales, este hecho junto a que son compuestos en general poco tóxicos los hace muy interesantes desde el punto de vista de su consideración como potenciales fármacos. A continuación se describen algunas propiedades que poseen o podrían estar en relación directa o indirecta con este trabajo.

Antioxidantes

Los flavonoides han mostrado actividad antioxidante, frente a peroxi-radicales, hidroxiradicales y anión superóxido. Estudios *in vitro* han mostrado que una mezcla de flavonoides naturales, puede detener la lipo-peroxidación en un homogenado de cerebro de rata, con una eficacia similar a la vitamina E^{7,8}.

Recientemente estudios *in vitro* demostraron que los flavonoides pueden modificar la expresión de genes que colaboran con la homeóstasis redox a través de la modulación de factores de transcripción sensibles al estrés oxidativo. En este contexto se ha demostrado que los flavonoides pueden modular las vías del factor nuclear κB (NF κB) y del factor nuclear eritroide-2 (Nrf2), las cuales inducen la expresión de señales de supervivencia, proteínas detoxificantes y antioxidantes como las enzimas superóxido dismutasas (SODs), glutatión peroxidasas y NADPH: quinona oxidoreductasas⁹⁻¹¹.

Inhibición de enzimas

Algunos flavonoides tienen la capacidad de inhibir enzimas cuya actividad genera radicales libres, como por ejemplo la enzima mitocondrial óxido nítrico sintetasa y la enzima xantina oxidasa, responsable de catalizar la conversión de xantina e hipoxantina a ácido úrico¹²⁻¹⁴.

Por otra parte, se ha asociado la actividad antitumoral de los flavonoides a su capacidad de inhibir algunas proteínas quinasas dependientes de ciclina¹⁵, proteínas tirosina quinasas¹⁶, topoisomerasas¹⁷ y proteínas quinasas C¹⁸.

Actividad anti-inflamatoria

La actividad anti inflamatoria de los flavonoides, es diversa. Se demostró que algunos flavonoides como el santin, procedente de la planta *Tanacetum parthenium*, es capaz de inhibir las enzimas ciclooxigenasa (COX) y la 5'-lipooxigenasa, dos enzimas importantes en el metabolismo de ácido araquidónico¹⁹. En el mismo contexto flavonoides como la cianidina son capaces de inhibir las isoformas 1 y 2 de la prostaglandina endoperoxido sintetasa (PGHS-1/2), las cuales son el blanco para el desarrollo de nuevos antiinflamatorios no esteroideos (AINEs). Si bien lo que se busca es inhibir específicamente la actividad PGHS-2, manteniendo la actividad PGHS-1 la cual está relacionada con los efectos adversos de los AINE¹⁹, derivados de la cianidina podrían ser útiles para lograr dicho efecto²⁰.

Otros flavonoides como el kaempferol y la apigenina han sido evaluados en inflamaciones cutáneas obteniéndose resultados positivos ya que estimulan la formación del tejido

granular. Particularmente la apigenina ha demostrado tener efecto sobre el crecimiento de los fibroblastos además de regular el sistema inmune frente al daño tisular^{21, 22}.

Finalmente la acción antiinflamatoria de los flavonoides puede estar mediada por la modulación del factor de transcripción Nrf2²³ como se describe más arriba.

Actividad sobre el SNC

Si bien se han demostrado diversos efectos de los flavonoides sobre el SNC, el campo de mayor interés, es el efecto neuroprotector de los mismos debido a su amplio rango de actividades antioxidantes, anti-inflamatorias, anticancerígenas, ansiolíticas y analgésicas²⁴.

En las principales enfermedades neurodegenerativas como lo son la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Alzheimer y en la esclerosis lateral amiotrófica (ELA), se ha descrito el que el daño oxidativo tiene un rol importante en la muerte neuronal y por ende en la progresión de la enfermedad²⁶. Debido a esto las propiedades anti-inflamatorias y antioxidantes intrínsecas de los flavonoides sumado a la capacidad de regular las vías de señalización que involucran al factor de transcripción Nrf2²³ se ha postulado el uso de flavonoides para el tratamiento de estas patologías.

En este sentido, estudios *in vivo* han demostrado los efectos beneficiosos de ciertos flavonoides en patologías del SNC como isquemias cerebrales, la enfermedad de Parkinson y la enfermedad de Alzheimer^{24, 25}. En esta última, llegando incluso al diseño y síntesis racional de flavonoides capaces de inhibir selectivamente la enzima acetilcolinesterasa y la formación de agregados del péptido beta amiloide β -amiloide, los cuales están estrechamente relacionados al deterioro cognitivo y la pérdida de la memoria que tienen lugar en esta enfermedad²⁷.

Esclerosis Lateral Amiotrófica

La Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA) es una enfermedad neurodegenerativa, que se caracteriza por el desarrollo de una parálisis muscular progresiva como resultado de la muerte selectiva de motoneuronas en la corteza cerebral, el tallo cerebral y la médula espinal²⁸. En la mayoría de los casos la aparición de la enfermedad es esporádica (90%),

es decir que no se ha evidenciado un componente genético relacionado, el 10% restante está ligado a factores genéticos y son heredados de manera dominante.

Los síntomas característicos de ELA son: i) debilidad y atrofia muscular progresiva, seguido por parálisis progresiva, como consecuencia de la pérdida incesante de motoneuronas, ii) fasciculaciones asociadas a la denervación muscular, iii) exaltación de los reflejos tendinosos, que reflejan la pérdida de control inhibitorio por la degeneración de la vía cortico-espinal.

Entre el 10% y el 20% de los casos heredados de ELA, son causados por mutaciones en el gen que codifica el enzima citosólica Cu/Zn Superóxido Dismutasa-1 (SOD1). Se han identificado más de 100 mutaciones en el gen que codifica para SOD1 capaces de generar la enfermedad²⁹. La identificación y aislamiento de estas mutaciones a partir de pacientes con ELA hereditaria ha permitido el desarrollo de modelos animales murinos de la enfermedad³⁰⁻³².

Papel de los astrocitos en el SNC

Los astrocitos, el tipo celular predominante en el sistema nervioso central (SNC), constituyen una población celular altamente plástica, renovable y heterogénea³³. En condiciones normales los astrocitos desempeñan funciones sumamente especializadas y estructuralmente localizadas que permiten el correcto funcionamiento del SNC. El soporte metabólico y trófico a las neuronas³⁴, el mantenimiento de la homeóstasis iónica y osmótica mediado por la regulación de los flujos de potasio y agua, son solo algunas de las funciones de este tipo celular; así como también la regulación de la excitabilidad neuronal y la neurotransmisión mediante el control de la disponibilidad de glutamato en la hendidura sináptica³⁵. De esta forma los astrocitos no solo proveen de un microambiente trófico, físico y metabólico para la sobrevivencia neuronal sino que también participan en la generación y el procesamiento de la información neural (proceso conocido como sinapsis tripartita)^{36, 37}.

En respuesta al daño del sistema nervioso central, los astrocitos responden adoptando un fenotipo reactivo (astrocitosis reactiva), caracterizado morfológicamente por hipertrofia de los núcleos y de los cuerpos celulares, aumento de la proliferación y por el desarrollo de procesos gruesos y largos con un alto contenido de GFAP (del inglés *Glial Fibrillary Acidic*

Protein). Las alteraciones morfológicas son el resultado de cambios en la expresión génica de una amplia gama de proteínas, entre las que se encuentran proteínas del citoesqueleto, de superficie o de matriz extracelular, proteasas, factores de crecimiento y citoquinas³⁸. La heterogeneidad astrogial también se observa en respuesta al daño. Los astrocitos de diferentes regiones del SNC no responden de la misma manera a un estímulo dado³⁹ y además, dentro de una misma región las respuestas varían dependiendo del estímulo³⁸. En tal sentido, la combinación de diferentes mediadores producidos en el microambiente de la lesión va a determinar el fenotipo astrocitario reactivo final⁴⁰.

La reactividad astrocitaria también se observa en la mayoría de las enfermedades neurodegenerativas, incluyendo enfermedades como Alzheimer^{41, 42}, Parkinson^{43, 44} y ELA^{45, 46}. En los últimos años el concepto de astrocitosis como una respuesta inespecífica de los astrocitos frente al daño neuronal ha cambiado. Si bien algunos autores ven a la astrocitosis como un intento del SNC de aislar la zona dañada, remover compuestos tóxicos producidos por las neuronas en degeneración y promover la supervivencia y el crecimiento neuronal^{38, 47}, otros autores consideran que una activación o de los astrocitos podría por un lado desencadenar estrés y/o muerte neuronal³².

Modelo animal y nuevos participantes en la progresión de la enfermedad

A partir de los casos heredados de ELA se han logrado identificar y aislar más de 100 mutaciones en el gen que codifica para SOD1 capaces de generar la enfermedad. Estas han permitido el desarrollo de modelos transgénicos murinos que han sido muy útiles para el estudio de la enfermedad^{48, 49}. En estos animales, la sobreexpresión de algunas mutaciones de SOD1 recapitulan fenómenos fisiopatológicos similares a los que ocurren en el ser humano, como la muerte de motoneuronas, la degeneración muscular y la subsiguiente parálisis progresiva hasta la muerte. Este proceso patológico no parece ser provocado por la pérdida de actividad catalítica de la SOD1 mutada sino que ha sido ligado a una ganancia de función neurotóxica que desencadena alteraciones en la química redox, la agregación proteica, la disfunción mitocondrial, el estrés de retículo, alteraciones en el transporte neuronal y la neuroinflamación⁵⁰.

El desarrollo de quimeras SOD1 mutada con células salvajes (wt) permitió demostrar que la toxicidad que genera la enzima mutada no es mediada por un solo tipo celular⁵¹. Un

abordaje celular más fino en el SNC se determinó que la sobreexpresión de la SOD1 mutada solo es capaz de producir efectos negativos cuando se expresa en al menos dos tipos celulares, la neurona y la glia. Ni la sobre-expresión de la SOD1 mutada exclusivamente en neuronas^{52, 53}, ni exclusivamente en astrocitos⁵⁴ fue capaz de desencadenar los eventos patológicos asociados a la ELA. A partir de estos resultados se ha hipotetizado que los eventos neurodegenerativos de la ELA, subyacen en la pérdida y/o la alteración de la comunicación glia-neurona⁵⁰. Otros estudios han demostrado que la eliminación de la SOD1 mutada específicamente en astrocitos aumenta la supervivencia de ratones transgénicos SOD1^{G93A} debido a una disminución del progreso de la enfermedad pero esto no afecta al inicio de la fase sintomática. En contribución con lo anteriormente descrito, estudios *in vitro* han demostrado que los astrocitos que expresan mutaciones de la SOD1 presentan una toxicidad selectiva para las motoneuronas salvajes tanto en cultivo como a través de factores liberados^{55, 56}.

En el mismo contexto, se ha observado la presencia de astrocitos reactivos rodeando motoneuronas espinales degenerantes en etapas iniciales de la enfermedad, incluso antes de la fase sintomática^{57, 58}. Esto sugiere que dichas células podrían tener un papel relevante en la muerte neuronal ulterior. En el asta ventral de la médula espinal de pacientes y en los modelos murinos de ELA, se observan astrocitos hipertróficos expresando altos niveles de GFAP y una batería de marcadores inflamatorios. Esta reactividad astrocitaria es progresiva y aumenta a medida que la enfermedad avanza⁵⁹. El estudio del rol de los astrocitos en la muerte de las motoneuronas ha cobrado relevancia en los últimos años permitiendo que los estudios en este campo sigan avanzando. Como consecuencia de esto, se ha reportado que astrocitos generados a partir de neuroblastos aislados en pacientes con ELA (post mortem) inducen la muerte de motoneuronas en cultivo⁶⁰, esto se ha vinculado con lo previamente descrito en modelos animales⁵⁵. Por otro lado, se demostró que la inyección intraespinal de astrocitos SOD1^{G93A} en ratas no transgénicas es capaz de inducir la muerte de motoneuronas desencadenando una disfunción respiratoria debido a la afección del nervio frénico⁶¹.

Por último y más reciente, el equipo de investigación del Laboratorio de Neurobiología Celular y Molecular del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable ha reportado el aislamiento de un nuevo fenotipo astrocitario aberrante presente en la médula de animales SOD^{G93A} durante la fase sintomática de la enfermedad. Estas células han sido denominadas AbA⁶² (del inglés, Aberrant Astrocytes) dado su particular fenotipo,

la caracterización de este nuevo tipo celular aspectos muy interesantes en cuanto a su comportamiento proliferativo, expresión de marcadores y toxicidad sobre la motoneuronas *in vitro*, siendo hasta el momento las células descritas con mayor potencial citotóxico para las neuronas motoras.

Además se ha demostrado de que la aparición de estas células está estrechamente relacionado con la aparición de la fase sintomática de la enfermedad y se han identificado AbAs proliferando alrededor de motoneuronas en la médula espinal de animales SOD1^{G93A} en fase sintomática.

La presencia de células con características similares a las células AbA también ha sido reportada en muestras autópsicas de pacientes con ELA⁶³, sugiriendo que la generación de células AbA no sería una particularidad del modelo animal y que células similares podrían desempeñar un papel en la enfermedad humana.

Actualidad farmacológica para el tratamiento de la ELA

Las estrategias farmacológicas para el tratamiento de ELA son extremadamente limitadas en la actualidad. Existe, como única herramienta terapéutica un derivado benzotiazólico, conocido como riluzol (Rilutek, Sanofi-Aventis, **Figura 4**), que retrasa el comienzo de la dependencia de la ventilación mecánica o traqueotomía, aumentando la expectativa de vida del paciente con ELA en 3 a 5 meses⁶⁴. En estudios de fase preclínica avanzados y de fase clínica iniciales se encuentra olesoxime⁶⁵, un análogo de colesterol desarrollado por Trophos SA (denominado TRO-19622, **Figura 4**), que posee notables propiedades neuroprotectoras de motoneuronas en animales de experimentación. En una etapa más inicial aún, ha sido propuesto el colorante catiónico azul de metileno (MB, **Figura 4**) como un potencial agente para el tratamiento de la enfermedad^{66, 67}.

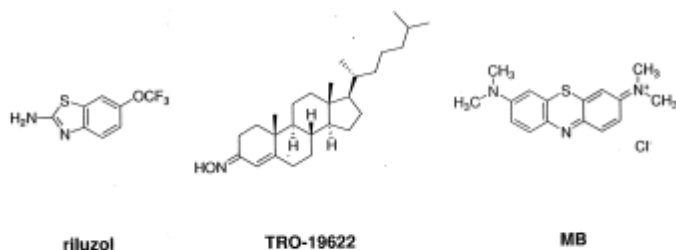


Figura 4. Agentes usados en distintas etapas de desarrollo, para el tratamiento de ELA.

Bajo este contexto farmacológico y combinado con los nuevos avances en ELA principalmente la descripción de un nuevo fenotipo astrocitario con gran potencial citotóxico para las motoneuronas. Se ha planteado la búsqueda de nuevas estrategias farmacológicas que causen citotoxicidad dirigida exclusivamente a las células AbA.

Búsqueda de una estrategia farmacológica para eliminar selectivamente las células AbA.

Inicialmente se buscó identificar compuestos que sean citotóxicos para las células AbA y no lo sean para los astrocitos normales. En estudios previos de nuestro grupo se seleccionaron flavonoides de origen sintético⁶⁸, pertenecientes a grupos estructurales definidos (chalconas, flavanonas y flavonas, **Figura 3**), estos compuestos fueron sintetizados por el Dr. Cabrera durante el desarrollo de su tesis doctoral⁶⁸.

Estos flavonoides demostraron poseer un comportamiento citotóxico diferencial hacia células tumorales⁶⁹ además demostraron ser quimiopreventivos del estrés oxidativo y electrofílico capaces de producir la translocación de Nrf-2 al núcleo y así por activación de la vía Nrf-2/ARE inducir enzimas detoxificantes de xenobióticos de fase II. Cabe destacar que no se habían realizado ensayos de carácter preclínicos hasta el momento.

En una primera instancia se realizó un cribado masivo en búsqueda de citotoxicidad diferencial hacia las células AbA, esto se llevó a cabo mediante el ensayo de Sulforodamina B donde se evaluaron a dosis fija (25 μ M) 19 compuestos (**Figura 5**). Los resultados biológicos fueron altamente prometedores y permitieron identificar un prototipo estructural (**Figura 5** y **Tabla 2**) capaz de depletar selectivamente astrocitos aberrantes (AbA).

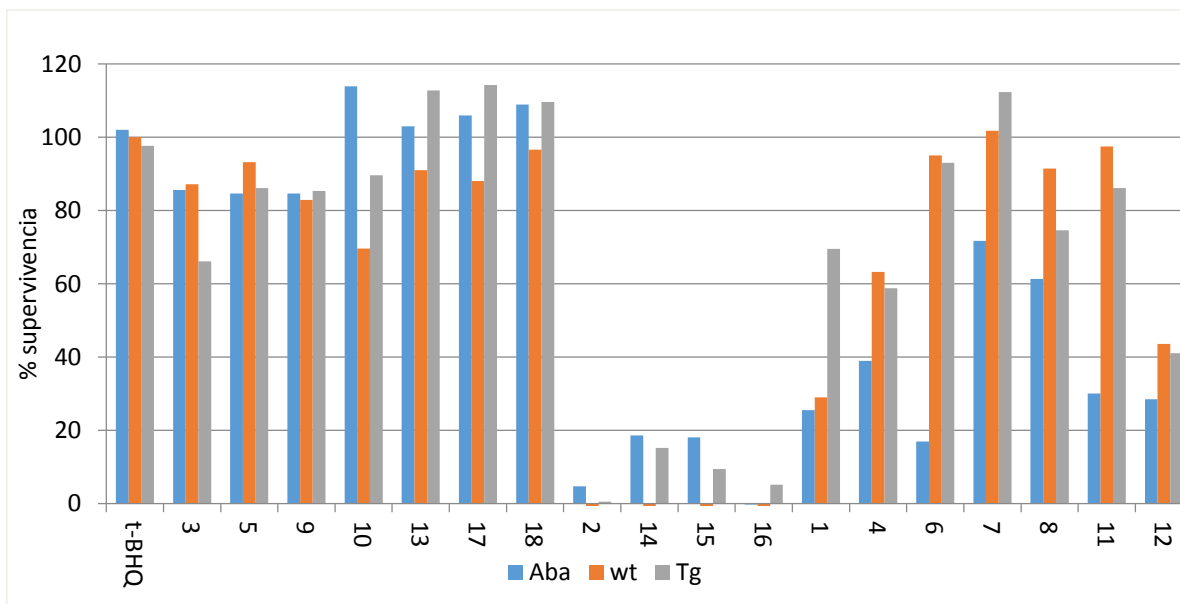


Figura 5. Se evalúa la supervivencia celular mediante la técnica de SRB luego del tratamiento con los compuestos 1-18 durante 24h a 25 μ M. Ejemplos significativos (de izquierda a derecha: compuestos inactivos, no selectivos, y selectivos) del cribado masivo en la búsqueda de citotoxicidad diferencial *in vitro* de agentes con diferente perfiles de activación de la vía Nrf-2-ARE (wt: astrocitos normales, Tg: astrocitos transgénicos para SOD1G93A, Aba: astrocitos aberrantes).

Analizando los resultados mostrados en la **Figura 5** se puede apreciar claramente que los 19 compuestos evaluados se pueden clasificar en tres grandes grupos: I) poco citotóxicos en los tres fenotipos celulares (compuestos **3, 5, 9, 10, 13, 17, 18**); II) muy citotóxicos en las tres líneas (**2, 14, 15, 16**) y III) citotóxicos selectivos frente a AbA (compuestos **1, 4, 6, 7, 8, 11, 12**).

*El compuesto más prometedor fue el derivado **6** (Figura 5), fue seleccionado para estudios posteriores y se pasará a llamar en este trabajo **CH38**.*

En segunda instancia se realizaron estudios dosis-respuesta *in vitro* para los productos más relevantes. De aquí surge una serie de líderes que a ciertas dosis poseen una adecuada ventana terapéutica. De estudios sobre líneas celulares en monocapa y con bajos niveles de factores de crecimiento se demostró que los compuestos son capaces de inducir la muerte selectiva de las células AbA no relacionada con la proliferación.

Tabla 2. Curva dosis-respuesta para el compuesto **6(CH38)**. En azul se muestra el rango de concentración en el cual la toxicidad sobre las células AbA es significativamente selectiva ($p < 0,05$)

Conc. (μM)	% Sobrevida		
	Astrocitos Neonatales		
	AbAs	Transgénicos	No-transgénico
1	65 $\pm$ 4	101 $\pm$ 5	103 $\pm$ 6
2,5	69 $\pm$ 4	101 $\pm$ 5	96 $\pm$ 7
5	67 $\pm$ 5	103 $\pm$ 2	91 $\pm$ 5
25	17 $\pm$ 9	95 $\pm$ 5	93 $\pm$ 9
50	10 $\pm$ 2	1	10 $\pm$ 5
100	7 $\pm$ 2	0	9 $\pm$ 6

En tercera instancia, se realizaron estudios preliminares *in vivo* con el compuesto **6**, ahora denominado **CH38**. Se analizó la sobrevida de animales SOD^{G93A} , utilizados como modelo animal de ELA, nuevamente se obtuvieron resultados prometedores aunque no estadísticamente significativos, debido al bajo número de animales utilizados.

Estudios de metabolismo y mutagenicidad han sido realizados en la tesina en Ciencias Biológicas de la Bachiller Nadia Presa⁷⁰. Se identificaron los principales productos de metabolismo hepático de CH38. Posteriormente se evaluó la capacidad mutagénica de CH38 y de sus metabolitos mediante test de AMES; el resultado obtenido fue que ninguna de las moléculas evaluadas resultó mutagénica.

Por último, en el marco de un trabajo experimental de una materia optativa de grado, el Bachiller Gabriel Otero, bajo la tutoría del Dr. Cabrera, evaluó la citotoxicidad en Aba de los metabolitos de CH38 los cuales mantuvieron la propiedad observada.

Además optimizó el escalado de CH38 durante el proceso de síntesis lo que permitió tener un stock lo suficientemente grande para la realización de los ensayos aquí presentados.

Materiales y métodos

Solubilidad: método turbidimétrico.

Se determinó la solubilidad siguiendo el procedimiento descrito por lipinski y colaboradores⁷¹⁻⁷³. Fueron agregados de a 1 µL de solución de CH38 en DMSO de concentración conocida en 2,5 mL de PBS pH=7,4 (**Figura 6**). Posteriormente a cada agregado, se midió la transmitancia de la solución a 620 nm, para esto fue utilizado el espectrofotómetro VARIAN CARY 50 Tablet- UV-Vis Spectrophotometer y una cuba de acrílico de 2mL. Concluidas las medidas, se graficó los valores de transmitancia en función de la concentración utilizando el

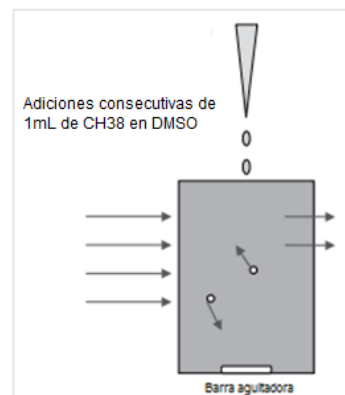


Figura 6. Esquema de Trabajo.

programa OriginPro 8.5®. El valor de solubilidad máxima se establece como el punto en el cual la transmitancia de la muestra comienza a descender.

Determinación del Log P

El Log P se define como el coeficiente de partición octanol-PBS de un compuesto en equilibrio. Matemáticamente se define como logaritmo del cociente de la concentración de un compuesto en una mezcla de disolventes inmiscibles, como lo son el octanol y el agua u otras disoluciones acuosas.

$$\text{Log} \left(\frac{[\text{Concentración}_{\text{en octanol}}]}{[\text{Concentración}_{\text{en H}_2\text{O}}]} \right)$$

Para determinar este parámetro, se utilizó la técnica conocida con el nombre de *shake flask*⁷⁴. Se colocaron 5mL de octanol recientemente destilado y 5 mL de PBS Dubelco® en un tubo falcon de 15mL. A continuación se agregaron 50µL de CH38 2000µM en DMSO.

El tubo falcon se agitó durante 1 min en vortex y luego se dejó incubar 24h a 20-25°C con agitación orbital. Posteriormente se centrifugó durante 5 min a 5000rpm y se tomaron con jeringa 1,5mL de cada fase.

Paralelamente se realizó el espectro de absorción de CH38 en cada uno de los disolventes utilizando el Espectrofotómetro VARIAN CARY 50 Tablet- UV- Vis Spectrophotometer y cubas de cuarzo de 1mL.

Se midió la absorbancia del compuesto entre 200-700nm, se determinó la longitud de onda de máxima absorbancia para cada uno de los disolventes.

Posteriormente se realizaron las curvas de calibración correspondientes y se midió la absorbancia de las fracciones obtenidas y así se cuantificó CH38 en cada fase.

Permeabilidad de Barrera Hematoencefálica (BHE)

Para estimar la capacidad de CH38 de atravesar la BHE se utilizó el método de $\Delta\text{Log P}$ el cual estima la contribución de los enlaces de puente de hidrógeno para predecir la factibilidad de que un compuesto atraviese la BHE⁷¹.

Para determinar el $\Delta\text{Log P}$ es necesario determinar el coeficiente partición ciclohexano-PBS y el octanol-PBS^{71, 75, 76}.

El procedimiento para la determinación del coeficiente de partición ciclohexano-PBS, fue exactamente idéntico al de octanol-PBS (anteriormente descrito), con la salvedad del ciclohexano, el cual se utilizó en lugar del octanol.

El $\Delta\text{Log P}$ se define como la diferencia entre el Log P octanol-PBS y el Log P ciclohexano-PBS. Es importante destacar que si bien matemáticamente podríamos simplificar esta ecuación (obviando al PBS), en la realidad el octanol y el ciclohexano son miscibles entre sí, lo que imposibilitaría la determinación de un coeficiente octanol-ciclohexano.

Unión a seroalbúmina humana (SAH)

Se preparó una solución de 5mL SAH 4% en PBS, ambos reactivos comerciales comprados a la empresa SIGMA, sin posterior purificación. A partir de disoluciones stock 2mM y 10mM de CH38 en DMSO, se prepararon 1mL de las diluciones 10, 25 y 50 μM correspondientes en PBS SAH 4%, teniendo en cuenta que el porcentaje de DMSO no superara el 1%. Se incubó las tres diluciones durante una hora con agitación.

Los filtros CORNING® 431478 Spin-X utilizados fueron cargados con 500 μL de agua Mili-Q y centrifugados durante 10min a 15000g, esto permite remover trazas de azida de sodio y glicerina presentes en los filtros.

Las diluciones fueron filtradas en dos pasos de 500µL, 10min a 15000g; con el fin de obtener 1mL de filtrado para la cuantificación. Además se filtró 1mL de solución PBS SAH 4% utilizada como control negativo.

La cuantificación se realizó en el espectrofotómetro VARIAN CARY 50 Tablet- UV- Vis Spectrophotometer, cuba de cuarzo de 1mL. Se realizó el espectro de absorción y la correspondiente curva de calibración a 348nm. Los datos obtenidos fueron procesados utilizando la siguiente ecuación:

$$[[Porcentaje\ de\ Union]] = \frac{[[Cantidad\ Inicial]] - [[Cantidad\ Final]]}{[[Cantidad\ Inicial]]} \times 100$$

Los valores obtenidos fueron promediados y expresados con su correspondiente desviación estándar.

Ensayo de toxicidad oral aguda

Para evaluar este parámetro se realizó el ensayo conocido como *Up & Down*, que permite estimar el valor de la dosis letal cincuenta (LD₅₀) que representa la máxima dosis administrada que provoca la muerte en el 50% de los animales tratados. Se siguió el protocolo descrito por la guía OECD⁷⁷ para dosis límite.

En este caso se utilizaron cinco ratas hembras Sprague dawley de ocho semanas de edad, adquiridas en la URBE de Facultad de Medicina, UdelaR. Los animales fueron administrados oralmente con 2000mg/kg de CH38 en un vehículo DMSO/Aceite y posteriormente monitoreados durante 48 horas. Una vez transcurridas las 48 horas, se evaluó la sobrevivencia de los animales y se procesó los datos utilizando el software aot425, el cual, a la vez que son ingresados los resultados calcula la siguiente dosis, como también determina la finalización del experimento.

Como criterio para evaluar la salud y bienestar de los animales a medida que transcurría el experimento, los animales fueron evaluados mediante test de Irwin^{78, 79}, el cual contempla aspectos comportamentales y fisiológicos.

En el caso de que un animal durante las 48 horas post administración presentara sintomatología notoria de toxicidad, este fue sacrificado, por parte del personal encargado. Por otro lado los animales que hayan sobrevivido a las 48 horas post

administración, continuaran en observación durante dos semanas; posteriormente serán sacrificados.

Evaluación del potencial terapéutico CH38 en un modelo animal de ELA

Modelo animal

Como modelo de estudio se utilizaron ratas transgénicas que expresen la mutación G93A de la enzima Cu, Zn superóxido dismutas-1 (SOD1 G93A) humana. Los animales utilizados fueron seleccionados de partos de cruzamientos de machos portadores del gen mutante con hembras no transgénicas. Como la segregación de este gen se da de forma mendeliana, se espera obtener aproximadamente un 50% de crías transgénicas SOD1 mutada y un 50% de crías no transgénicas. Para determinar cuáles crías son transgénicas y cuáles no, se realizó el genotipado de las mismas utilizando como método la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a partir de ADN genómico extraído de un fragmento de la cola⁸⁰.

Principios de la PCR

La técnica de PCR permite amplificar *in vitro* una secuencia de ADN del cual es principalmente necesario conocer la secuencia que constituye los extremos. El empleo de esta técnica permite generar miles de copias de la secuencia de interés en un período de tiempo relativamente corto, debido a esto, no es novedoso que se la encuentre como técnica de rutina en muchos laboratorios de investigación y diagnóstico.

La PCR es una técnica *In vitro* que simula el proceso de replicación *in vivo*. Básicamente se centra en ciclos repetitivos de desnaturalización, hibridación y extensión.

- Durante la desnaturalización, las cadenas de ADN son calentadas a 95° con el fin obtener moldes de ADN monocatenario. El tiempo de desnaturalización depende del contenido de GC y del largo de la cadena.
- Hibridación, en esta etapa se desea que los cebadores hibriden con la secuencia complementaria dentro de la secuencia molde. Es importante que la temperatura

de hibridación sea óptima para que la hibridación sea correcta y específica; usualmente oscila entre 50-60°C.

- Extensión, aquí es donde la ADN polimerasa extiende los cebadores desde sus extremos 3', para ello, es necesario utilizar una polimerasa termoestable que soporte las temperaturas alcanzadas durante cada ciclo, esta propiedad de las polimerasas ha permitido la automatización del proceso. Además para que el proceso sea específico y eficiente, la temperatura de óptima de la polimerasa debe estar por encima de la de hibridación, pero tampoco puede ser muy elevada. Por este motivo suele utilizarse la ADN Taq polimerasa la cual tiene una temperatura óptima de 72°C.

Las cadenas de ADN que son sintetizadas en un ciclo, pueden servir como molde para el próximo ciclo, por lo tanto a medida que avanzan los ciclos, la cantidad de ADN sintetizado aumenta exponencialmente.

En condiciones normales, cuando se realiza una PCR, la manipulación de la muestra y de los materiales se realiza con especial cuidado, debido a que una contaminación con ADN exógeno podría amplificarse y posteriormente generar falsos positivos. En este caso se amplificó un transgen humano, por lo que la principal fuente de contaminación son los operarios mismos.

Genotipado por PCR

A continuación se detalla el protocolo seguido para el genotipado de todos los animales.

Todo el material utilizado (tips, eppendorf, buffers, etc) fue esterilizado por autoclavado.

1. Aproximadamente al mes del parto las ratas fueron destetadas y marcadas con orificios en las orejas, siguiendo un código específico para posteriormente identificar a los animales. Además se les cortó aproximadamente 5mm de la cola.
2. La porción de tejido se coloca en un eppendorf con 300µL de buffer de digestión de cola (TBD: *Tail Digestion Buffer*), posteriormente se agregan 185µL de TBD + 15µL de proteinasa K (New England BioLabs Inc. #P8102S)
3. Se incuban durante 15 minutos a 65° C para inactivar posibles ADNasas. Luego se disminuyó la temperatura a 50°C durante 8 horas, temperatura óptima de la proteinasa K. Por último se incubó durante 15 minutos a 95°C para inactivar la

proteínasa y evitar que posteriormente degrade a la Taq polimerasa (Fermentas #EP0402).

4. Luego de centrifugar cada tubo por 10 minutos a 12.000g para poder sedimentar los restos de tejido sin digerir, se toman 10µL del sobrenadante y se hace una dilución 1:20 en agua. De esta dilución se toman 1,5µL para realizar la PCR.

A continuación se muestra una tabla que detalla los volúmenes utilizados en cada reacción de PCR. El cálculo se realizó para N + 1 tubos. Teniendo en cuenta la inclusión de un blanco, al cual no se le agregó ADN.

Stock	Concentración	Volumen (µL)
H2O para PCR	-	14,5
PCR buffer (Perkin Elmer) 10X	1X	2
MgCl₂ 25mM	1,5 mM	1,2
dNTP's 5mM (Invitrogen)	0,2 mM	0,8
Cebadores 10µM	0,2 µM	0,4
Taq Polimerasa 5U/µL	0,25 U/µL	1
Volumen Final	-	19

Tabla 3. Volúmenes utilizados para cada reacción de PCR

Los cebadores utilizados fueron proporcionados por integrated DNA Technologies (IA, USA) y su secuencia se detalla abajo

Forward. 5' ACC TAA TCC CGA CTA CGC TG 3'

Reverse. 5' AGT AAC CGG CGT GTG ACC AC 3'

Cada uno de los tubos de PCR se mantuvo en hielo para inhibir la actividad Taq polimerasa.

A cada uno de los tubos se le agregó 1,5µL de la solución del sobrenadante conteniendo ADN y se llevó al termociclador (Biometra).

A continuación se detallan las temperaturas y el tiempo establecido para cada uno de los pasos de los ciclos.

Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Propósito
95	2	Activación de la Taqpol.
95	0,5	Desnaturalización de ADN
60	0,5	Unión del Cebador
72	0,5	Elongación
72	5	Completar amplicones de ADN simple hebra

Tabla 4. Tiempos y temperaturas de cada uno de los pasos de PCR

Los pasos de desnaturalización, hibridación y elongación se repitieron 35 veces.

Electroforesis en gel de poliacrilamida

Con el objetivo de visualizar los amplicones generados por PCR, se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida 6% en TBE (Tris-Borate-EDTA: 90mM Tris, 89 mM Ác. Bórico, 2mM EDTA) con peines de 1,5 mm de espesor.

Los geles de poliacrilamida, con frecuencia son utilizados para caracterizar proteínas y ADN de bajo peso molecular (entre 80 pb y 300pb). En contraste con los geles de agarosa, los geles de poliacrilamida tienen un poder resolutivo mayor, pero son ineficientes cuando se desea separar secuencias de ADN de gran tamaño. En este caso los amplicones esperados son e 160pb, es por esto que es preferible utilizar geles de poliacrilamida.

La técnica consiste en la elaboración de una fina capa de gel de acrilamida adherida a una lámina de vidrio por la cual el ADN migra. Esta migración se debe a la respuesta de la carga negativa del ADN cuando es sometido a un campo eléctrico, el tamaño de la molécula y la densidad del gel. Gracias a que la densidad de carga de ADN es constante, las distintas moléculas solo se diferenciarán por su peso molecular, y como estamos hablando de polímeros de nucleótidos, podemos simplificar esto como “su tamaño”.

La técnica se llevó a cabo en cinco pasos: el montaje de la cámara de electroforesis, la preparación de la solución de poliacrilamida y llenado de la cámara de electroforesis, la precorrida del gel, la corrida de las muestras y la tinción del gel.

A continuación se detalla la receta para la preparación del gel

8mL de TBE 1X

2mL de stock de bis-acrilamida (30:1)

100μL de APS (persulfato de amonio 10% P/v)

10μL TEMED (*N, N, N', N' – Tetrametiletilendiamina*)

En cada uno de los posillos del gel se cargaron 5μL del producto de PCR más 1,5 μL de buffer de carga 6X (0,25% azul de bromofenol, 0,25% *Xileno Cianol* (del inglés *Xylene Cyanol*) FF, 30 % Glicerol, en H₂O destilada.

La electroforesis se realizó a 80 V (40mA) durante 40 minutos.

Análisis de la PCR

El análisis de la PCR nos permite discriminar entre los animales positivos para la mutación SOD1^{G93A} de los no transgénicos

Para esto se realiza la tinción del gel con una solución nitrato de plata (AgNO₃), también conocida como tinción argéntica. Como se describe más abajo, la misma consiste en sumergir el gel de acrilamida en la solución de fijación, posteriormente el gel se incuba en la solución de nitrato de plata y finalmente se procede al revelado en el cual se determina la presencia o ausencia del amplicon. La detección en geles de poliacrilamida tenidos con AgNO₃ ofrece la mejor relación costo/beneficio. Durante el proceso de tinción, es muy importante respetar los tiempos de cada paso; a continuación se describe la serie de pasos a seguir:

Luego de finalizada la electroforesis se desmonta el gel en una solución de fijación (500 μL Ác. Acético, 13,7 mL de Etanol, en 100 mL de H₂O destilada). Se mantiene en agitación suave durante 10 minutos.

Se recupera la solución fijadora y se incuba durante 10 minutos en la solución de nitrato de plata (0,2g AgNO₃ en 100mL de H₂O destilada).

Luego de recuperar la solución de cloruro de plata, se lava rápidamente tres veces con H₂O destilada, para quitar el exceso de plata no unido al ADN.

Se incuba con la solución de revelado (3g de NaOH, 500 μL de formaldehído, en 100mL de H₂O destilada). Se mantiene en la solución con agitación suave hasta divisar nítidamente las bandas.

Tratamiento con CH38 *in vivo*

Luego de genotipados los animales, se seleccionaron diez ratas transgénicas para SOD1^{G93A}, a cinco de estos animales se les administró oralmente a partir del 4^{to} mes de vida, una serie de tres dosis 150mg/kg de CH38 semanales en un vehículo DMSO/Aceite. El otro grupo de cinco animales, se les administró solamente el vehículo, por lo tanto este grupo constituyó el grupo control.

Periódicamente se evaluó y pesó a cada animal, lo que permitió recalcular dosis a lo largo del experimento.

El criterio de finalización del experimento, se correlaciona con el *criterio de punto final*. De este modo se planeó evaluar la sobrevida de los animales tratados, como también el punto de inicio de la fase sintomática.

Objetivos

Objetivo general

Contribuir al desarrollo preclínico del flavonoide sintético CH38 como potencial fármaco para el tratamiento de la esclerosis lateral amiotrófica. Determinación de propiedades estructurales, fisicoquímicas, bioquímicas, evaluación de toxicidad aguda y uso de un modelo animal de ELA para comprobar su efectividad.

Objetivos específicos

1. Determinación de la solubilidad de CH38 en disolventes acuosos.
2. Determinación de la lipofilia de CH38 mediante la determinación del coeficiente de partición octanol-PBS (Log P).
3. Estimación in vitro de la permeabilidad de CH38 a la barrera hematoencefálica.
3. Determinación del porcentaje de unión de CH38 a la proteína seroalbúmina humana
4. Estimación del LD50 de CH38 en ratas Sprague dawley.
5. Evaluar la sobrevida de animales tratados con CH38 en un modelo animal de ELA.

Resultados y discusión

CH38 presenta una baja solubilidad en disolventes acuosos.

El valor de solubilidad fue determinado por el método de turbidimetría descrito por Lipinski⁷³, en el cual se fue agregando de a 1µL de CH38 2mg/mL en DMSO a un volumen de 2,5 mL de solución amortiguadora fosfato, pH 7,4 (PBS).

µL agregados	Concentración µM	Transmitancia
1	7,87	0,985
2	6,29	0,986
3	9,44	0,986
4	12,59	0,955
5	15,77	0,929
6	18,85	0,904
7	21,99	0,887
8	25,12	0,863
9	28,24	0,841

Tabla 5. Valores de transmitancia obtenidos para las distintas concentraciones de CH38

Utilizando el ajuste de regresión lineal en el programa OriginPro[®] se determinó las ecuaciones de las rectas que mejor ajustan a los datos obtenidos. Posteriormente se igualó las ecuaciones y se despejó el parámetro X el cual equivale al valor máximo de solubilidad del compuesto en PBS; en este caso el valor fue de **8,7µM**.

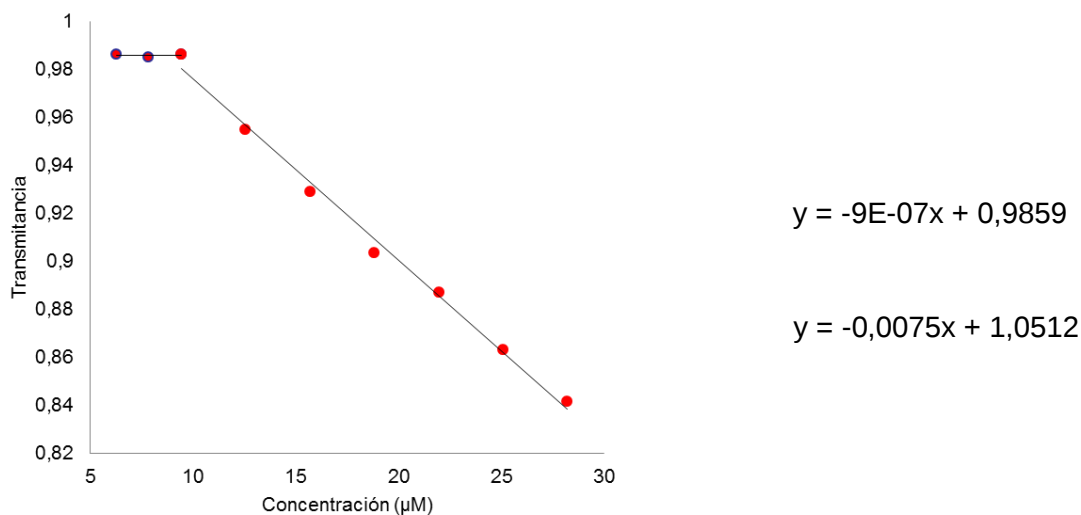


Figura 7. Gráfico de transmitancia vs concentración

Un valor de solubilidad tan bajo puede ser problemático porque puede afectar parámetros *in vivo* como la absorción intestinal debido a la precipitación del compuesto, el transporte pasivo del compuesto y su biodistribución en general.

Si bien una baja solubilidad no es un resultado positivo, los problemas que esto conlleva pueden ser superados si el compuesto presenta características como ser altamente específico para un determinado blanco, una alta permeabilidad y/o presenta transportadores activos que le permiten circular en el torrente sanguíneo y atravesar membranas de células epiteliales⁸¹.

Por otro lado cabe destacar que se realizaron ensayos a 25 y 50 µM no observándose macroscópicamente ningún signo de no-solubilización como turbidez o precipitación. Incluso se tuvo la precaución de observar la solución al microscopio y no se evidenció la presencia de cristales. Puede ser que el método de Lipinski estime una subvaloración de la máxima solubilidad del compuesto⁷¹. De todas maneras resulta útil dado que arroja un valor de solubilidad por debajo del cual podemos afirmar con certeza que el compuesto será soluble 100%. En concordancia con esto en la **Figura 8** se compara la solubilidad determinada por turbidimetría (servicio prestado por la empresa Cyprotex ®) con los datos de solubilidad publicados por terceros (valores determinados mediante HPLC-UV/VIS) para distintos fármacos comerciales^{83, 83}. Claramente se puede observar que la solubilidad

hallada mediante el método turbidimétrico utilizado por Cyprotex ® puede diferir de otros valores.

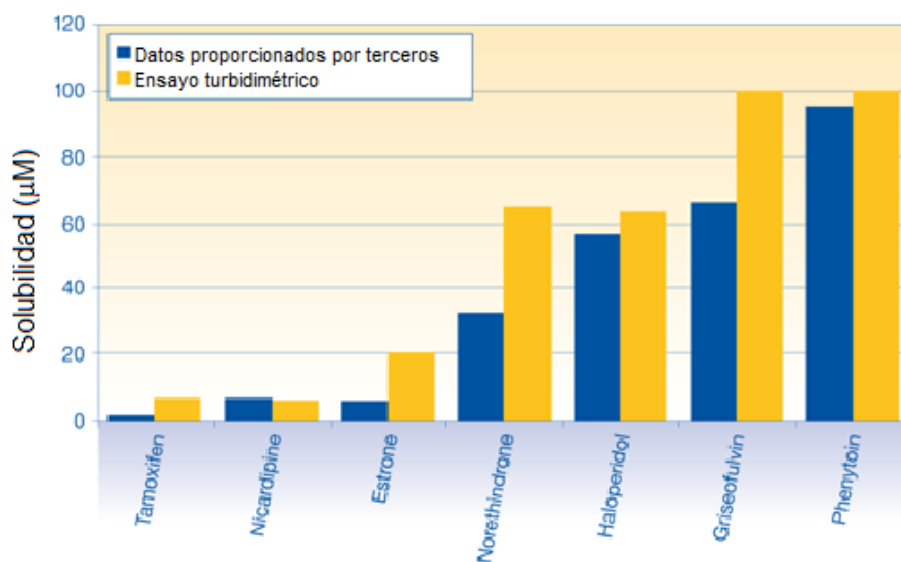


Figura 8. Tabla comparativa de valores de solubilidad determinados por la empresa Cyprotex ® mediante turbidimetría vs valores de solubilidad determinados por terceros mediante HPLC-UV/VIS.

Como se aprecia en la **Figura 8**, existen fármacos comerciales que tienen una baja solubilidad en disolventes acuosos pero esto no ha sido un impedimento para que el fármaco llegue al mercado, un claro ejemplo de esto es el Tamoxifeno.

CH38 es un compuesto de carácter mayoritariamente liposoluble

El estudio de la lipofilicidad de un compuesto es una de las propiedades fisicoquímicas más estudiadas, usualmente se realizan experimentos para determinar esta propiedad a modo rutinario cuando se pretende describir un nuevo fármaco. Esta propiedad se define como la tendencia de un compuesto a distribuirse entre una fase acuosa y una fase no polar lipídica de un compuesto.

La lipofilicidad además está relacionada con otras propiedades como la solubilidad, permeabilidad, metabolismo, toxicidad y distribución.

En este caso el valor de Log P determinado fue de 1,7, este valor cae dentro de un rango ideal en el cual se espera que el compuesto presente una buena absorción intestinal y un buen balance entre solubilidad y permeabilidad de barreras lipídicas. Valores de Log P bajos hablan de una buena solubilidad pero una mala permeabilidad, absorción y posiblemente una muy alta tasa de eliminación renal. Por otro lado valores altos de Log P también se relacionan con una baja absorción, aunque se espera que estos compuestos presenten buena permeabilidad; además a mayor Log P se ha visto que los compuestos tienden a unirse a enzimas que son parte del metabolismo.

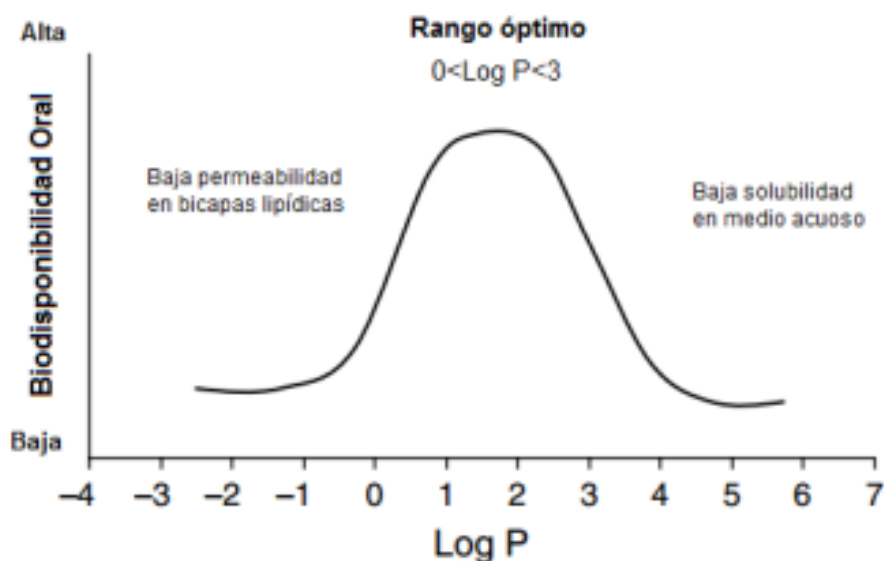


Figura 9. Figura que ilustra el rango óptimo de Log P.

En conclusión, el valor de Log P obtenido cae dentro de un rango ideal, aunque esto podría contraponerse con el bajo valor de solubilidad obtenido. Para aclarar esto, se determinó el Log P conociendo de antemano el valor de solubilidad, esto fue considerado en la puesta a punto del experimento, en la cual la concentración de CH38 no debiese superar la previamente determinada.

CH38 es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica

La barrera hematoencefálica (BHE) es una estructura compleja formada principalmente por células epiteliales y gliales, su principal función es proteger al SNC restringiendo el pasaje de sustancias tóxicas, no restringiendo metabolitos necesarios para el correcto funcionamiento del SNC.

La búsqueda de compuestos capaces de atravesar la barrera es de gran interés debido a que cuando se busca desarrollar un fármaco que actúe en el SNC, es necesario que este sea capaz de atravesarla para así dar con su blanco. Debido a esto, si buscamos que CH38 sea capaz de interactuar con los AbA *in vivo*, es necesario conocer si el compuesto es capaz de atravesar la barrera.

El ensayo de ΔLogP estima la capacidad de atravesar la BHE, el método se basa en estimar la contribución de los enlaces de hidrógeno. Para ello es necesario determinar el coeficiente de partición octanol-PBS y el coeficiente de partición ciclohexano-PBS posteriormente estos valores son restados. Técnicamente el octanol es capaz de establecer enlaces de hidrógeno con el fármaco, mientras que el ciclohexano no, simulando un contexto totalmente hidrofóbico como lo sería en el interior de una membrana celular.

Se establece que un valor de ΔLogP menor a 2 para un compuesto, es probable que este atraviese la BHE⁷¹. En el caso de CH38 el valor del coeficiente de partición ciclohexano-PBS fue de 1,9 y el ΔLogP de 0,2. Si bien el resultado es positivo, no hay que olvidar que se trata de una estimación fisicoquímica. Por lo tanto amerita ensayos posteriores que refuercen este resultado con ensayos *in vitro* que implementen el uso de células ya que estos experimentos se aproximan a lo sucedido *in vivo*. Dentro de estos se encuentran los ensayos de permeabilidad que utilizan la línea celular comercial Caco-2 para generar condiciones similares a las que tienen lugar en un tejido epitelial, contemplando transporte activo y permeación paracelular

CH38 presenta un alto porcentaje de unión a seroalbúmina humana (SAH)

La unión de un fármaco a proteínas plasmáticas puede afectar enormemente la eficacia terapéutica del mismo. La mayoría de los tratamientos farmacológicos aprovecha el torrente sanguíneo para la distribución de los fármacos en los tejidos de interés. Dentro del torrente sanguíneo los fármacos están en equilibrio entre el fármaco libre y el fármaco unido a proteínas plasmáticas. La fracción del fármaco libre es la que exhibe los efectos farmacológicos, la fracción unida a proteínas está relacionada con la vida media farmacológica en sangre y puede generar un reservorio farmacológico que libere al fármaco paulatinamente potenciando así los efectos farmacológicos. Otra propiedad y quizás la más sobresaliente en el caso de CH38 es que la unión a proteínas plasmáticas facilita el transporte de fármacos poco hidrosolubles ya que sin esto estos fármacos no podrían llegar a su sitio diana en cantidades suficientes como para generar acción terapéutica.

Dentro de las Proteínas plasmáticas la albúmina es la proteína que se encuentra en mayor proporción, aproximadamente el 55% de las proteínas plasmáticas. Las principales funciones de la albúmina son el mantenimiento de la presión oncótica y la unión y transporte de diversos ligandos que generalmente presentan cierto carácter hidrofóbico como ácidos grasos, hormonas liposolubles, hormonas tiroideas y fármacos.

El porcentaje de unión a seroalbúmina humana de CH38 fue del 80%, nuevamente el resultado parece ser muy prometedor y se podría reforzar con algún estudio *in vivo* en el cual se administre a animales con una dosis dada de CH38 y posteriormente se realice una extracción de sangre y se la analice mediante HPLC.

CH38 muestra baja toxicidad aguda

Evaluar la máxima dosis tolerada de un fármaco es un procedimiento de rutina para las compañías farmacéuticas ya que cuándo se plantea desarrollar un nuevo fármaco, lo primero que pensamos es en mejorar la calidad de vida de los potenciales pacientes. Por lo tanto es necesario evaluar los posibles efectos tóxicos que un compuesto puede ocasionar y los posibles efectos secundarios del mismo.

El ensayo de *Up & Down* permite estimar la dosis letal cincuenta de un compuesto (**LD50**) en animales. Para este ensayo se utilizan como mínimo 5 animales a los cuales se los administra con una única dosis del compuesto a evaluar y se los deja en observación durante 48 horas y posteriormente 2 semanas. A medida que transcurre el experimento la dosis administrada cambia en función de la sobrevida y/o muerte de los animales anteriormente tratados.

En el ensayo de CH38 fueron necesarias cinco ratas hembras Sprague dawley, el tipo de ensayo se denominó a dosis límite puesto que se inició administrando la dosis máxima sugerida (2000mg/kg). Los cinco animales tratados posteriormente sobrevivieron a las 2 semanas post administración sin mostrar signo evidente de alguna alteración fisiológica y/o comportamental (**test de Irwin**), la estimación del LD50 arrojó como resultado un **LD50 > 2000mg/kg**. Este resultado no solo demuestra que a una única dosis excesivamente alta el compuesto no es tóxico sino que también nos permite plantearnos una ventana terapéutica bastante amplia aunque a la hora de extrapolar estos resultados a un modelo humano siempre hay que tener en consideración las diferencias farmacocinéticas entre los modelos humanos y los animales.

La administración de CH38 mostró una leve tendencia protectora en el modelo animal de ELA.

Por último ya con una serie de resultados prometedores se procedió a evaluar la sobrevida de ratas SOD1^{G93A} tratadas con CH38, para ello se utilizaron 10 animales, 5 correspondientes al grupo tratado y 5 al grupo control. Los animales fueron tratados con 3 dosis semanales de CH38 150mg/kg a partir del cuarto mes de vida, luego de dos semanas previas en donde se comenzó a evaluar el peso y estado de los animales. El grupo control fue tratado con el vehículo descrito en materiales y métodos.

El resultado obtenido se ve representado en la **Figura 10** en la que se puede observar una tendencia neuroprotectora evidenciada en la aparición de la fase sintomática de la enfermedad y en un aumento de la sobrevida de los animales tratados. Una dificultad a la que nos enfrentamos utilizando este modelo animal, fue la variabilidad del modelo en cuanto a la aparición de la fase sintomática de la enfermedad la cual puede llegar a variar en un máximo de 2 semanas en animales hermanos pertenecientes a la misma camada.

Esto hace que los resultados no sean estadísticamente significativos si bien es evidente la tendencia al aumento de la sobrevida en los animales tratados.

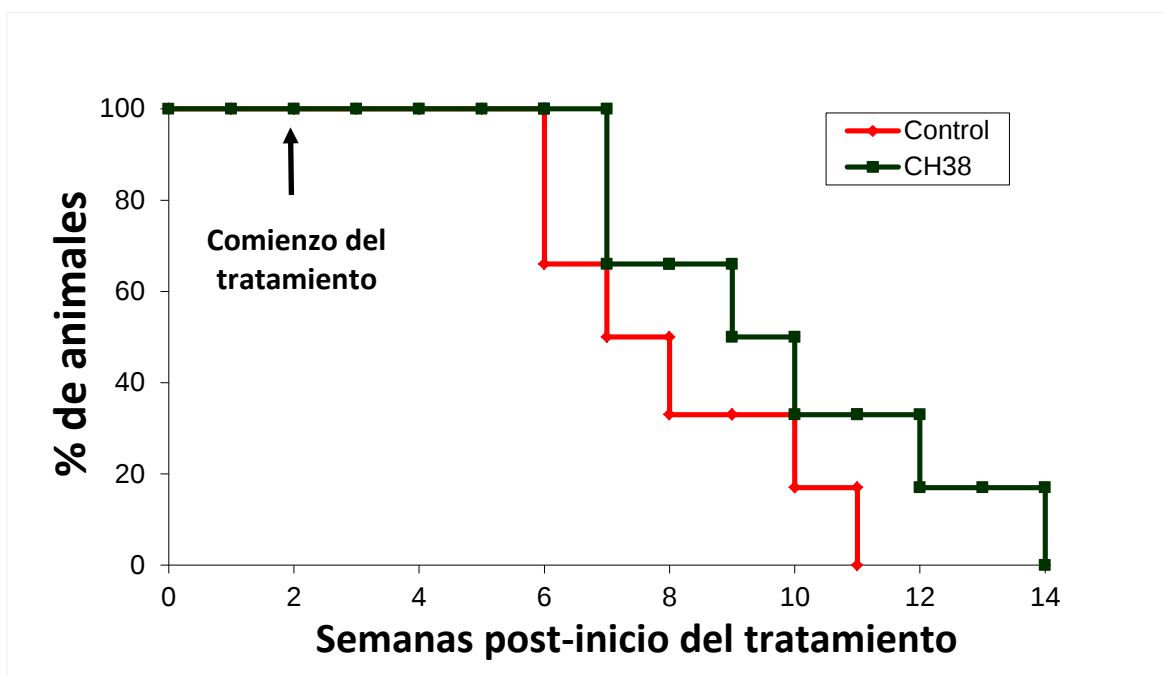


Figura 10. Curva de Kaplan-Meier para los animales tratados con CH38, en el gráfico se compara la sobrevida del grupo de animales administrados con CH38 versus el grupo que recibió el vehículo.

Otro resultado obtenido fue la tolerancia de los animales a dosis reiteradas de CH38 por un largo período de tiempo, no observándose diferencias aparentes con los animales del grupo control.

Como crítica constructiva hacia este último ensayo, se podría haber extraído líquido cefalorraquídeo de algún animal tratado y compararlo con el de animales control mediante HPLC. También se podría hacer disección de la médula espinal de animales de ambos grupos para evidenciar diferencias de algún cambio estructural mediante microscopía.

Conclusiones y perspectivas

En este trabajo se realizaron importantes aportes acerca de las diferentes propiedades del flavonoide sintético CH38 que podrían ser relevantes para su potencial uso en la clínica. Por un lado se realizaron distintos ensayos fisicoquímicos, bioquímicos y biológicos los cuales arrojaron resultados concluyentes y prometedores. En tal sentido se demostró que CH38 es una molécula de mediana-baja solubilidad en disolventes acuosos, que no muestra toxicidad importante y es probablemente capaz de atravesar la barrera hematoencefálica gracias a la alta lipofilicidad y a la unión a proteínas plasmáticas.

Por otro lado con relación al efecto terapéutico de CH38 en el modelo animal de ELA se observó una leve tendencia no significativa de la sobrevida en animales tratados. Considerando el poco conocimiento sobre las concentraciones de CH38 y sus metabolitos que se alcanzan en el líquido cefalorraquídeo a la dosis utilizada esta tendencia protectora, aunque leve, constituye un resultado que amerita estudios posteriores. Este aumento en la sobrevida podría que esté relacionado con las capacidades neuroprotectoras de los flavonoides y de la interacción de CH38 con los AbA.

Debido a lo mencionado anteriormente, se plantean las siguientes perspectivas:

- Realizar estudios *in vivo* del rol que juega CH38 en el SNC y su interacción con los AbA.
- realizar otros estudios fisicoquímicos que ayuden a conectar los resultados ya obtenidos. Seguir profundizando en el desarrollo preclínico como por ejemplo realizar estudios de estabilidad plasmática de CH38 y estudios de estabilidad metabólica.

Referencias

1. Novartis, Investigación y desarrollo, Proceso de desarrollo de fármacos <http://www.novartis.es/innovacion/b7dc842f-3ec8-4424-ac23-030621425dc2/2cc866dea4d6-42af963d-b9ee584b1900> fecha de acceso: 01/03/2015
2. Prentis, R. A., Lis, Y., & Walker, S. R. Pharmaceutical innovation by the seven UK-owned pharmaceutical companies (1964–1985). *British Journal of Clinical Pharmacology*, 1988, 25, 387–396
3. Kola, I., & Landis, J. Opinion: Can the pharmaceutical industry reduce attrition rates? *Nature Reviews Drug Discovery*, 2004, 3, 711–716.
4. Jeffrey B. Harborne, Christine A. Williams. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*, 2000, 55, 481-504.
5. Marcel Karabín, Tereza Hudcová, Lukáš Jelínek, Pavel Dostálek. Biotransformations and biological activities of hop flavonoids. *Biotechnology Advances*, 2015, 33 (2), Pages 243-302
6. João Henrique G. Lago, Alessandra C. Toledo-Arruda, Márcia Mernak , Kaidu H. Barrosa, Milton A. Martins, Iolanda F. L. C. Tibério and Carla M. Prado. *Structure-Activity Association of Flavonoids in Lung Diseases Molecules*, 2014, 19, 3570-3595
7. Miyase, T., Sano, M., Nakai, H., Muraoka, M., Nakazawa, M., Suzuki, M., Yoshino, K., Nishihara, Y., Tanai, T.. Antioxidants from *Lespedeza homoloba*. (I). *Phytochemistry*, 1999, 52, 303-310.
8. Miyase, T., Sano, M., Yoshino, K., Nonaka, K. Antioxidants from *Lespedeza homoloba* (II). *Phytochemistry*, 1999 52, 311-319.
9. Granado-Serrano, A. B., Martín, M. A., Bravo, L., Goya, L., & Ramos, S. Quercetin induces apoptosis via caspase activation, regulation of Bcl-2, and inhibition of PI-3-kinase/Akt and ERK pathways in a human hepatoma cell line (HepG2). *J. Nutr.*, 2006, 136(11), 2715-2721.
10. Seelinger, G., Merfort, I., Schempp, C.M. Anti-oxidant, antiinflammatory and anti-allergic activities of luteolin. *Planta Med.*, 2008, 74(14), 1667-1677.
11. Arredondo, F.; Echeverry, C.; Abin-Carriquiry, J.A.; Blasina, F.; Antúnez, K.; Jones, D.P.; Go, Y.M.; Liang, Y.L.; Dajas, F. After cellular internalization, quercetin causes Nrf2 nuclear translocation, increases glutathione levels, and prevents neuronal death against an oxidative insult. *Free Radic. Biol. Med.*, 2010, 49(5), 738-47.
12. Hodnick, W.F., Duval, D.L., Pardini, R.S. Inhibition of mitochondrial respiration and cyanide-stimulated generation of reactive oxygen species by selective flavonoids. *Biochemical Pharmacology*, 1994, 47, 573-580.
13. Middleton, E. Jr.; Kandaswami, C.; Theoharides TC. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacol. Rev.*, 2000, 52(4), 673-751.
14. Cos, P., Ying, L., Calomme, M., Hu, J.P., Cimanga, K., Van Poel, B., Pieters, L., Vlietinck, A.J., Vanden, Berghe D. Structure-activity relationship and classification of flavonoids as inhibitors of xanthine oxidase and superoxide scavengers. *Journal of Natural Products*, 1998, 61, 71-76.
15. Sedlacek, H.H.; Czech, J.; Naik, R.; Kaur, G.; Worland, P.; Losiewicz, M.; Parker, B.; Carlson, B.; Smith, A.; Senderowicz, A.; Sausville, E.: Flavopiridol, a new kinase inhibitor for tumor therapy. *Int. J. Oncol.* 1996, 9, 1143-1168.

16. Cushman M, Zhu H, Geahlen RL, Kraker AJ. Synthesis and biochemical evaluation of a series of aminoflavones as potential inhibitors of protein-tyrosine kinases p56lck, EGFr, and p60v-src. *J Med Chem.* 1994 Sep 30;37(20):3353-62.
17. Yamashita Y, Kawada S, Nakano H. Induction of mammalian topoisomerase II dependent DNA cleavage by nonintercalative flavonoids, genistein and orobol. *Biochem Pharmacol.* 1990 Feb 15;39(4):737-44.
18. Ferriola PC, Cody V, Middleton E Jr. Protein kinase C inhibition by plant flavonoids. Kinetic mechanisms and structure-activity relationships. *Biochem Pharmacol.* 1989 May 15;38(10):1617-24.
19. Williams, C.A., Harborne, J.B., Geiger, H., Houlst, J.R.S. The flavonoids of *Tanacetum parthenium* and *T. vulgare* and their antiinflammatory properties. *Phytochemistry*, 1999 51, 417-423.
20. Wang, H., Nair, M.G., Strasburg, G.M., Chang, Y.-C., Booren, A.M., Gray, J.I., Dewitt, D.L. Antioxidant and anti-inflammatory activities of anthocyanins and their aglycone, cyanidin, from tart cherries. *Journal of Natural Products*, 1999, 62, 294-296.
21. Koganov, M.M., Dueva, O.V., Tsorin, B.L. Activities of plantderived phenols in a fibroblast cell culture model. *Journal of Natural Products* 62, 481-483.
22. Calderón-Montaña, J.M.; Burgos-Morón, E.; Pérez-Guerrero, C.; López-Lázaro, M. A. Review on the dietary flavonoid kaempferol. *Mini Rev. Med. Chem.*, 2011, 11(4), 298-344.
23. Florencia Arredondo, Carolina Echeverry, Juan A. Abin-Carriquiry, Fernanda Blasina, Karina Antúnez, Dean P. Jones, Young-Mi Go, Yong-Liang Liang, Federico Dajas. *Free Radical Biology & Medicine*, 2010, 49, 738–747
24. Dajas, F.; Rivera-Megret, F.; Blasina, F.; Abin-Carriquiry, A.; Cosata, G.; Echeverry, C.; Lafon, L.; Heizen, H.; Ferreira, M.; Morquio, A. Neuroprotection by flavonoids. *Braz. J. Med. Biol. Res*, 2003, 36(12), 1613-20.
25. Simonyi, A.; Wang, Q.; Miller, R.L.; Yusof, M.; Shelat, P.B.; Sun, A.Y.; Sun, G.Y. Polyphenols in cerebral ischemia novel targets for neuroprotection. *Mol. Neurobiol.*, 2005, 31, 135-47.
26. Quinton R.D. Jones, Jordan Warford, H.P. Vasantha Rupasinghe, and George S. Robertson. Target-based selection of flavonoids for neurodegenerative disorders. *Trends in Pharmacological Sciences*, 2012, 33(11), 602-610.
27. Ren-Shi Li, Xiao-Bing Wang, Xiao-Jun Hu, Ling-Yi Kong. Design, synthesis and evaluation of flavonoid derivatives as potential multifunctional acetylcholinesterase inhibitors against Alzheimer's disease. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2013, 23, 2636–2641.
28. L. C. Wijesekera, P. N. Leigh, Amyotrophic lateral sclerosis. *Orphanet journal of rare diseases* 4, 3 (2009).
29. A. E. Renton, A. Chio, B. J. Traynor, State of play in amyotrophic lateral sclerosis genetics. *Nature neuroscience* 17, 17 (Jan, 2014).
30. M. E. Gurney, Transgenic-mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *The New England journal of medicine* 331, 1721 (Dec 22, 1994).
31. L. I. Bruijn *et al.*, Elevated free nitrotyrosine levels, but not protein-bound nitrotyrosine or hydroxyl radicals, throughout amyotrophic lateral sclerosis (ALS)-like disease implicate tyrosine nitration as an aberrant in vivo property of one familial ALS-linked superoxide dismutase 1 mutant. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 7606 (Jul 8, 1997).
32. D. S. Howland *et al.*, Focal loss of the glutamate transporter EAAT2 in a transgenic rat model of SOD1 mutant-mediated amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 1604 (Feb 5, 2002).

33. Wilkin, G.P., D.R. Marriott, and A.J. Cholewinski, *Astrocyte heterogeneity*. Trends Neurosci, 1990. **13**(2): p. 43-6.
34. Tsacopoulos, M. and P.J. Magistretti, *Metabolic coupling between glia and neurons*. J Neurosci, 1996. **16**(3): p. 877-85.
35. Volterra, A. and J. Meldolesi, *Astrocytes, from brain glue to communication elements: the revolution continues*. Nat Rev Neurosci, 2005. **6**(8): p. 626-40.
36. Murphy, S. and B. Pearce, *Functional receptors for neurotransmitters on astroglial cells*. Neuroscience, 1987. **22**(2): p. 381-94.
37. Bezzi, P., et al., *Neuron-astrocyte cross-talk during synaptic transmission: physiological and neuropathological implications*. Prog Brain Res, 2001. **132**: p. 255-65.
38. Eddleston, M. and L. Mucke, *Molecular profile of reactive astrocytes--implications for their role in neurologic disease*. Neuroscience, 1993. **54**(1): p. 15-36.
39. Hill, S.J., E. Barbarese, and T.K. McIntosh, *Regional heterogeneity in the response of astrocytes following traumatic brain injury in the adult rat*. J Neuropathol Exp Neurol, 1996. **55**(12): p. 1221-9.
40. Ridet, J.L., et al., *Reactive astrocytes: cellular and molecular cues to biological function*. Trends Neurosci, 1997. **20**(12): p. 570-7.
41. McGeer, P.L. and E.G. McGeer, *Local neuroinflammation and the progression of Alzheimer's disease*. J Neurovirol, 2002. **8**(6): p. 529-38.
42. Monsonogo, A. and H.L. Weiner, *Immunotherapeutic approaches to Alzheimer's disease*. Science, 2003. **302**(5646): p. 834-8.
43. Hirsch, E.C., et al., *The role of glial reaction and inflammation in Parkinson's disease*. Ann N Y Acad Sci, 2003. **991**: p. 214-28.
44. Teismann, P., et al., *Pathogenic role of glial cells in Parkinson's disease*. Mov Disord, 2003. **18**(2): p. 121-9.
45. McGeer, P.L. and E.G. McGeer, *Inflammatory processes in amyotrophic lateral sclerosis*. Muscle Nerve, 2002. **26**(4): p. 459-70.
46. Schiffer, D. and V. Fiano, *Astrogliosis in ALS: possible interpretations according to pathogenetic hypotheses*. Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord, 2004. **5**(1): p. 22-5.
47. Giulian, D., *Reactive glia as rivals in regulating neuronal survival*. Glia, 1993. **7**(1): p. 102-10.
48. Allaman, I., M. Belanger, and P.J. Magistretti, *Astrocyte-neuron metabolic relationships: for better and for worse*. Trends Neurosci, 2011. **34**(2): p. 76-87.
49. Gurney, M.E., et al., *Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu,Zn superoxide dismutase mutation*. Science, 1994. **264**(5166): p. 1772-5.
50. Boillee, S., C. Vande Velde, and D.W. Cleveland, *ALS: a disease of motor neurons and their nonneuronal neighbors*. Neuron, 2006. **52**(1): p. 39-59.
51. Clement, A.M., et al., *Wild-type nonneuronal cells extend survival of SOD1 mutant motor neurons in ALS mice*. Science, 2003. **302**(5642): p. 113-7.
52. Pramatarova, A., et al., *Neuron-specific expression of mutant superoxide dismutase 1 in transgenic mice does not lead to motor impairment*. J Neurosci, 2001. **21**(10): p. 3369-74.

53. Lino, M.M., C. Schneider, and P. Caroni, *Accumulation of SOD1 mutants in postnatal motoneurons does not cause motoneuron pathology or motoneuron disease*. J Neurosci, 2002. **22**(12): p. 4825-32.
54. Gong, Y.H., et al., *Restricted expression of G86R Cu/Zn superoxide dismutase in astrocytes results in astrocytosis but does not cause motoneuron degeneration*. J Neurosci, 2000. **20**(2): p. 660-5.
55. Vargas, M.R., et al., *Increased glutathione biosynthesis by Nrf2 activation in astrocytes prevents p75NTR-dependent motor neuron apoptosis*. J Neurochem, 2006. **97**(3): p. 687-96.
56. Nagai, M., et al., *Astrocytes expressing ALS-linked mutated SOD1 release factors selectively toxic to motor neurons*. Nat Neurosci, 2007. **10**(5): p. 615-22.
57. Kushner, P.D., D.T. Stephenson, and S. Wright, *Reactive astrogliosis is widespread in the subcortical white matter of amyotrophic lateral sclerosis brain*. J Neuropathol Exp Neurol, 1991. **50**(3): p. 263-77.
58. Schiffer, D., et al., *Reactive astrogliosis of the spinal cord in amyotrophic lateral sclerosis*. J Neurol Sci, 1996. **139 Suppl**: p. 27-33.
59. Hirano, A., *Neuropathology of ALS: an overview*. Neurology, 1996. **47**(4 Suppl 2): p. S63-6.
60. Haidet-Phillips, A.M., et al., *Astrocytes from familial and sporadic ALS patients are toxic to motor neurons*. Nat Biotechnol, 2011. **29**(9): p. 824-8.
61. Papadeas, S.T., et al., *Astrocytes carrying the superoxide dismutase 1 (SOD1G93A) mutation induce wild-type motor neuron degeneration in vivo*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011.
62. Díaz-Amarilla P, Oliveira-Bravo S, Trias E, Cargnolini A, Martinez-Palma L, Cassina P, Beckman J, Barbeito L (2011) Phenotypically aberrant astrocytes that promote motoneuron damage in a model of inherited amyotrophic lateral sclerosis. PNAS 108: 18126-18131.
63. Migheli, A., et al., *S-100beta protein is upregulated in astrocytes and motor neurons in the spinal cord of patients with amyotrophic lateral sclerosis*. Neurosci Lett, 1999. **261**(1-2): p. 25-8.
64. Bergstrom, P, Andersson, HC, Gao, Y, Karlsson, JO, Nodin, C, Anderson, MF, Nilsson, M, Hammarsten, O (2011) Repeated transient sulforaphane stimulation in astrocytes leads to prolonged Nrf2-mediated gene expression and protection from superoxide-induced damage. Neuropharmacol 60:343-353.
65. Vauzour, D, Buonfiglio, M, Corona, G, Chirafisi, J, Vafeiadou, K, Angeloni, C, Hrelia, S, Hrelia, P, Spencer, JP (2010) Sulforaphane protects cortical neurons against 5-Scysteinyldopamine-induced toxicity through the activation of ERK1/2, Nrf-2 and the upregulation of detoxification enzymes. Mol Nutr Food Res 54:532-542.
66. Brandenburg, LO, Kipp, M, Lucius, R, Pufe, T, Wruck, CJ (2010) Sulforaphane suppresses LPS-induced inflammation in primary rat microglia. Inflamm Res 59:443-450.
67. Fimognari, C, Turrini, E, Ferruzzi, L, Lenzi, M, Hrelia, P (2011) Natural isothiocyanates: Genotoxic potential versus chemoprevention. Mutat Res, en prensa.
68. Cabrera, M. Flavonoides y análogos como moduladores de enzimas detoxificantes de xenobióticos. Potenciales agentes quimiopreventivos para el cáncer. Tesis doctoral Facultad de Química-UdelaR.
69. Cabrera, M, Simoens, M, Falchi, G, Lavaggi, ML, Piro, OE, Castellano, EE, Vidal, A, Azqueta, A, Monge, A, López de Ceraín, 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* 15:3356-3367.

70. Presa, N. *Perfil Metabólico y mutagénico de un flavonoide para el tratamiento de la esclerosis lateral amiotrófica. Tesina de grado en curso. Facultad de Ciencias-UdelaR.*
71. Drug-like properties: concepts, structure desing and methods.” Edward H. Kerns and Li Di. Academic Press, Elsevier Inc. 2008
72. Lipinski, C. A., Lombardo, F., Dominy, B. W., & Feeney, P. J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings.Advanced. *Drug Delivery Reviews*, 1997, 23, 3–25.
73. Lipinski, C. A. Computational and experimental approaches to avoiding solubility and oral absorption problems in early discovery. June 19–20, 2000, Princeton, NJ. Drew University Residential School on Medicinal Chemistry. Designing drugs with optimal in vivo activity after oral administration.
74. OECD Guideline for the Testing of Chemicals, Adopted by the Council on 27th July 1995, Partition Coefficient (n-octanol/water): Shake Flask Method.” 1995.
75. Young, R. C., Mitchell, R. C., Brown, T. H., Ganellin, C. R., Griffiths, R., Jones, M., et al. Development of a new physicochemical model for brain penetration and its application to the design of centrally acting H2 receptor histamine antagonists. *Journal of Medicinal Chemistry*, 1988, 31, 656–671.
76. Kramer, S. D. Absorption prediction from physicochemical parameters. *Pharmaceutical Science & Technology Today*, 1999, 2, 373–380.
77. OECD Guideline for the Testing of Chemicals, Adopted 27th December 2001, Acute Oral Toxicity- Up and.Down Procedure.” 2001.
78. V. Golozoubova, T.K. Brodersen, S. Klasturp, M. Oksama, J. Løgsted, A. Makin. Repeated measurements of motor activity in rats in long-term toxicity studies. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* 70 (2014) 241–245.
79. S.Irwin. Comprensive Observational Assesment: A Systematic, Quantative Procedure for Assesing the Behavioal and Physiologic State of the Mouse. *Psychopharmed*, 1968, 13, 222.-257.
80. D. S. Howland et al., “Focal loss of the glutamate transporter EAAT2 in a transgenic rat model of SOD1 mutant-mediated amyotrophic lateral sclerosis (ALS).” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 9 9, 1604 (Feb 5, 2002)

81. Douglas B. Kell, Stephen G. Oliver. How drugs get into cells: tested and testable predictions to help discriminate between transporter-mediated uptake and lipoidal bilayer diffusion. *Front. Pharmacol*, 2014, 31.
82. Turbidimetric Solubility Assay. <http://www.cyprotex.com/physicochemicalprofiling/physicochemical-properties/turbidimetric-solubility> fecha de acceso: 04/03/2015
83. Kerns EH and Di L. (2005) *Journal of the Association for Laboratory Automation* 10(2); 114-123