

00550



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

PROGRAMA DE MAESTRIA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUIMICAS

"SINTESIS Y EVALUACION DEL EFECTO CITOTOXICO DE
NUEVAS 2,6-DIARILIDENCICLOHEXANONAS Y SUS
COMPUESTOS DE REACCION CON 6-AMINO-1,3-
DIMETILURACILO"

T E S I S

PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS
P R E S E N T A :
Q.F.B. MIGUEL ANGEL MARTINEZ URBINA

TUTOR: DRA. ANGELINA QUINTERO RUIZ



2005

M 344296



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

orizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e imprimir el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Miguel Ángel Martínez Urbina

FECHA: 20 mayo 2005

FIRMA: 

Agradecimientos:

El presente trabajo fue realizado en su parte biológica en el laboratorio 202 de biología molecular de la facultad de química de la UNAM, asesorado por la Dra. Angelina Quintero Ruiz a quien agradezco pues durante todo el tiempo en el que realicé esta tesis estuvo pendiente para orientarme con sus recomendaciones.

En su parte química este trabajo se realizó en el laboratorio 1-1 del Instituto de Química de la UNAM bajo la dirección del Dr. Angel Guzmán Sánchez a quien le estoy muy agradecido por todo su apoyo y consejos.

Al CONACyT por apoyarme durante seis meses con la beca número 162820.

A los integrantes del jurado por su apoyo y comprensión en la revisión de esta tesis:

Dr. Angel Guzmán Sánchez
Dr. Marco Antonio Cerbón Cervantes
Dr. Mario Ordóñez Palacios
Dr. Moisés Romero Ortega
Dr. José Guillermo Penieres.

A la Bióloga Rocío Morales por su gran apoyo en la realización de la citometría de flujo.

Al M. en C. Carlos Villarreal Martínez por su gran ayuda en la elucidación espectroscópica de la moléculas.

Indice

Resumen	1
Introducción	2
1. Antecedentes	4
1.1 Cáncer	4
1.2 El ciclo celular y el cáncer	5
1.3 Muerte celular	11
1.4 Terapia del cáncer	13
1.5 Descubrimiento de nuevos fármacos citotóxicos	17
1.6 Chalconas	20
1.6.1 Actividad biológica de las chalconas	21
1.6.2 Mecanismos de acción	25
1.7 Actividad biológica de compuestos unidos a una base pirimídica	28
2. Objetivos e hipótesis	30
2.1 Objetivos generales	30
2.1.1 Objetivos particulares	30
2.2 Hipótesis	30
3. Resultados	31
3.1 Parte química	31
3.2 Parte biológica	35
4. Análisis de resultados	46
4.1 Parte química	46
4.2 Parte biológica	50
5. Conclusiones	54
6. Parte experimental	55
6.1 Parte química	55
6.2 Parte biológica	63
7. Apéndices	65
8. Referencias	70

Resumen

En este trabajo se sintetizaron trece compuestos derivados de las 2,6-diarilidenciclohexanonas **5-17**. A los compuestos sintetizados se les determinó su actividad citotóxica *in vitro* así como el efecto del compuesto biológicamente más activo en la distribución de las diferentes fases del ciclo celular.

Dos de estos compuestos sintetizados fueron los más citotóxicos, siendo el derivado **9** el más potente. De igual forma se observó que las 2,6-diarilidenciclohexanonas pierden su actividad cuando se les adiciona en su estructura una molécula de 6-amino-1,3-dimetiluracilo. Los resultados obtenidos incrementan el conocimiento de los requerimientos estructurales de este tipo de moléculas para su actividad citotóxica.

Por otra parte, el análisis del ciclo celular muestra que el compuesto **9** tiene un efecto múltiple en el ciclo, ocasionando arrestos transitorios en algunas de estas fases, así como producción de muerte celular.

Introducción

El cáncer es una enfermedad en la cual los mecanismos encargados de regular la proliferación celular están fuera de control, es decir, las células presentan un desorden en el control de su crecimiento y diferenciación. El cáncer es un padecimiento multifactorial que puede tener varias causas como la dieta, herencia, hábitos de higiene, medio ambiente y efectos de compuestos químicos (Rubenstein y Federmann, 1997).

El cáncer es un problema de salud pública en el ámbito mundial. Según cifras de la Organización Mundial de la Salud, cada año se registran cerca de 10 millones de nuevos casos, de éstos casi la mitad pertenecen a países en desarrollo y aproximadamente 5 millones de personas mueren anualmente (Parkin y Muir, 2001). En México, el cáncer es una de las enfermedades con mayor tasa de mortalidad en la población (13%) registrándose para el año 2001 alrededor de 54 843 defunciones por este mal (IMSS, 2003).

El tratamiento de este padecimiento está basado en la radioterapia y la quimioterapia, actualmente la quimioterapia tiene como objetivo el uso de fármacos para tratar la enfermedad sin dañar al paciente. La efectividad de la quimioterapia depende de la naturaleza del cáncer, ya que no existe un agente único para todas las neoplasias.

La quimioterapia también está limitada por la citotoxicidad de los fármacos a las células normales y por el desarrollo de resistencia por parte de las células cancerosas (Hofmann, 1990). La resistencia depende en parte de la inestabilidad genética, la heterogeneidad y el alto rango mutacional de las células tumorales (Boehm, *et al.*, 1997)

Por lo anterior, es necesario encontrar nuevos agentes químicos contra el cáncer que puedan diferenciar entre células normales y neoplásicas.

En este sentido, los productos naturales desempeñan un papel importante en el descubrimiento de nuevos compuestos con actividad biológica, una serie de compuestos con una actividad prometedora en este campo son las chalconas. Las chalconas, derivados de las 1,3-diarilprop-1-en-3-onas están ampliamente distribuidas en el reino vegetal (Lawrence, 2000) y se ha encontrado que tienen varios efectos biológicos potencialmente

explotables como por ejemplo con características antiinflamatorias (Herencia, *et al.*, 1998; Hsieh, *et al.*, 1998), antimaláricas (Li, *et al.*, 1995), antileismaniásicas (Chen, *et al.*, 1993), anticancerosas y antimitóticas (Ducki, *et al.*, 1997; Satomi, 1993; Lawrence, 2000).

En el presente trabajo se describe la síntesis de una serie de 8 nuevas 2,6-diarilidenciclohexanonas que poseen una estructura semejante a la de las chalconas y además se preparan 5 de sus derivados por adición del 6-amino-1,3-dimetiluracilo a estas, con la finalidad de evaluar su citotoxicidad en las líneas celulares HeLa y C33 de cáncer de cérvix humano, SW480 de cáncer colorrectal humano, MCF-7 de cáncer de mama humano y K562 de leucemia humana.

Adicionalmente, se describe un análisis del ciclo celular en la línea HeLa después de ser tratada con el compuesto más activo en diferentes concentraciones con la finalidad de identificar posibles blancos de estos derivados en la maquinaria que regula el ciclo. Los resultados obtenidos proporcionan información básica de los requerimientos estructurales de estos nuevos compuestos en relación a su actividad citotóxica.

1. Antecedentes

1.1 Cáncer

El cáncer es una enfermedad en la cual los mecanismos de regulación de la proliferación celular están fuera de control, es decir las células presentan un desorden en el control de su crecimiento y diferenciación (Rubenstein y Federmann, 1997).

El desarrollo de este padecimiento comienza con la alteración genética de una célula dentro de un tejido. Esta mutación permite una proliferación acelerada de la célula y forma una hiperplasia o displasia, esta última lleva a la formación de un tumor, que puede permanecer localizado en su sitio de origen o invadir tejidos circundantes y formar metástasis (Dulbecco, 1983; Brown *et al.*, 1998; Darnell *et al.*, 1999)

Las células cancerosa tienen algunas propiedades para competir exitosamente contra las células normales: 1) Bajo condiciones apropiadas, las células cancerosas son capaces de dividirse casi infinitamente, mientras que las células normales tienen una vida limitada de aproximadamente 50 veces de división (número de Hayflick); es el caso de células epiteliales humanas *in vitro* (Hayflick y Hayflick, 1961). 2) Las células normales se encuentran unidas unas a otras y a la matriz extracelular. Las células cancerosas generalmente no se adhieren y además poseen la habilidad para migrar del sitio donde comienzan invadiendo tejidos circundantes y formando masas (metástasis) en sitios distantes del tejido en donde se encuentran vía el torrente sanguíneo.

El cáncer surge debido a efectos específicos de factores ambientales tales como el hábito de fumar y la dieta, además de los antecedentes genéticos. En otros cánceres como el cáncer de mama y de próstata se involucra a las hormonas y el factor genético parece ser un factor de riesgo más poderoso que el estilo de vida. Dos clases de genes son los de más ingerencia en el origen del cáncer. Los protooncogenes fomentan el crecimiento tumoral, mientras que los genes supresores tumorales lo inhiben. La acción coordinada de esas dos clases de genes normalmente regula la proliferación de la célula; sin embargo, cuando mutan, los oncogenes promueven una división celular excesiva, mientras que los genes

supresores tumorales fallan en bloquear el mecanismo de división (Lewin, 1997; Marshall, 1991).

A nivel molecular, el control de la división celular es mantenido por la acción inhibitoria de varias moléculas tales como los genes pRB, p15, p16, p21 y p53 sobre proteínas que promueven la división celular, especialmente los complejos entre ciclinas y cinasas dependientes de ciclinas (Meijer *et al.*, 1997).

El desarrollo tumoral es un proceso de pasos múltiples que requiere de una acumulación de mutaciones en estos genes. Las causas ambientales del cáncer comprenden un grupo de factores extremadamente diversos que pueden actuar como carcinógenos, ya sea al mutar genes o por promover la proliferación de células anormales (Sugimura, 1986; Greenwald, 1996 y Wakabayashi *et al.*, 1997). Muchos de estos agentes han sido identificados mediante estudios epidemiológicos, aunque la naturaleza exacta de su actividad al nivel biológico permanece obscura. Estos factores incluyen sustancias químicas (tales como las que se encuentran en el tabaco, asbestos, desperdicios industriales y pesticidas), dieta (grasas saturadas, carnes rojas y sobrepeso), radiación ionizante, patógenos (Epstein-Barr, *Helicobacter pylori* y diversos virus, entre ellos el de la hepatitis B y el papiloma humano). Sin embargo, para que los factores ambientales tengan un efecto significativo, se debe estar expuesto a ellos por un tiempo relativamente largo (IARC, 1995; Sugimura, 1996; Mihich, 1995).

1.2 El ciclo celular y el cáncer

Las células eucariontes tienen vías de señalización que coordinan las transiciones en el ciclo celular y garantizan la replicación del genoma antes de la división de la célula figura-A (Stewart *et al.*, 2003).

La progresión del ciclo celular es estimulada por complejos de proteincinasas que contienen una ciclina y una cinasa dependiente de ciclina CDK (Sherr y Roberts, 1999). Las cinasas dependientes de ciclinas son expresadas constitutivamente a través del ciclo celular, mientras que los niveles de ciclinas son restringidos por regulación transcripcional y por

degradación mediante ubiquitinación (Koepp *et al.*, 1999). La activación de las CDK requiere de su unión a una ciclina (Sherr y Roberts, 1999).

Los procesos oncogénicos ejercen su efecto al actuar sobre los reguladores de la progresión de la fase G1. Durante la fase G1 las células responden a señales extracelulares para avanzar hacia otra división o quedarse en un estado latente G0. A diferencia del tránsito a través de las fases S, G2 y M la progresión de G1 normalmente recae en la estimulación por mitógenos y puede ser bloqueada por citosinas antiproliferativas. Las células cancerosas abandonan estos controles y permanecen en el ciclo, lo que puede facilitar su maduración y diferenciación terminal (Sherr, 1996).

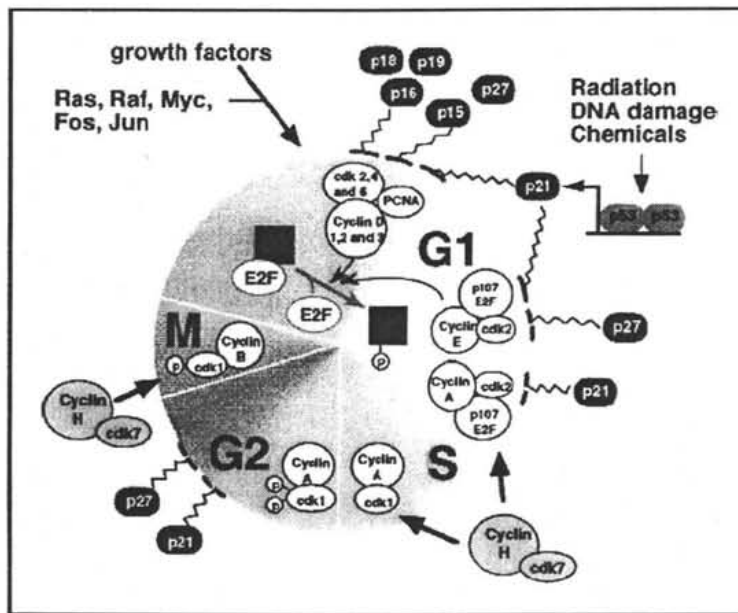


Figura A. Representación esquemática del ciclo celular que muestra las vías en las que actúan las cinasas dependientes de ciclinas.

Los complejos ciclina-D-CDK4, ciclina-D-CDK6, ciclina-E-CDK2 y ciclina-A-CDK2 regulan la progresión de la fase G1 a la S (Sherr y Roberts, 1999). La proteína de retinoblastoma (pRB) es un sustrato esencial de los complejos activados ciclina-CDK en la fase G1. La proteína pRB es secuencialmente fosforilada por los complejos ciclina-D-CDK4,6 y ciclina-E-CDK2 durante la progresión de la fase G1, lo que reprime o activa la transcripción de genes dependiendo de su estado de fosforilación y proteínas asociadas. La

proteína pRB fosforilada se une e inactiva miembros de la familia de factores de transcripción E2F (Zheng y Lee, 2001). Ya que los miembros de la familia E2F regulan la transcripción de genes requeridos para la síntesis de ADN, la unión de pRB hipofosforilado a E2F detiene a las células en la fase G1. Durante la progresión de la fase G1, la hiperfosforilación de pRB mediada por CDK resulta en la disociación de pRB y E2F y la célula entra en la fase S (figura B) (Stewart *et al.*, 2003).

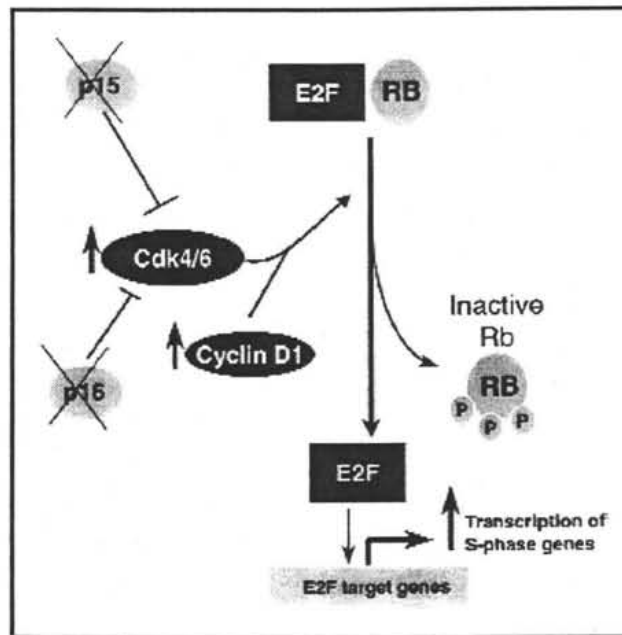


Figura B. Inactivación de la vía de Rb. En esta vía Rb es inactivada por fosforilación (P) mediante el complejo CDK 4/6-ciclina D1, lo que origina la liberación de los factores de crecimiento E2F y el inicio de la fase S.

La progresión de la fase G2 a la M es regulada por el complejo ciclina-B-CDK1. Los complejos inactivos ciclina-B-CDK1 se acumulan mediante la fase G2 del ciclo celular ya que la fosforilación de CDK1 por Wee1 y Myt1 inhibe la actividad de CDK1. La entrada a la mitosis requiere que los complejos ciclina-B-CDK1 sean activados por la fosfatasa CDC25C, la cual remueve la fosforilación inhibitoria de CDK1 (Smits y Medema, 2001). La salida de la mitosis ocurre después de la ubiquitinación y degradación proteolítica de la ciclina-B por el complejo promotor de anafase APC (Koepp *et al.*, 1999).

Las células eucariontes también han desarrollado mecanismos de control que restringen la transición del ciclo celular en respuesta al estrés. Esas vías de señalización son llamadas puntos de control o “checkpoints”. Las células pueden ser arrestadas transitoriamente en diferentes puntos de control del ciclo celular para permitir la reparación del daño celular. Alternativamente, si el daño es irreparable, las señalizaciones del punto de control pueden activar vías que conducen a una muerte celular. La pérdida de la integridad de los puntos de control puede permitir la propagación de lesiones en el ADN y resultar en alteraciones genómicas permanentes (Paulovich, 1997).

Los puntos de control para la transición G1-S dependen de la inhibición de los complejos ciclina CDK. Las CDK son reguladas negativamente por dos familias de compuestos, los INK4 que disminuyen la actividad de CDK4 y CDK6 durante la fase G1 y los Cip/Kip que disminuyen a las CDK durante todas las fases del ciclo (Sherr y Roberts, 1999). Por otra parte, después de que las células normales son expuestas a agentes genotóxicos, la transcripción de p21 es activada por la proteína supresora tumoral p53. La proteína p21 se une e inactiva los complejos ciclina-E-CDk2, lo que resulta en la hipofosforilación de pRB y la detención de las células en la transición G1-S (Stewart y Pietenpol, 2001). La proteína p16 regula el arresto en G1 independiente de p53 como respuesta a un daño al ADN en varios tipos de células mediante la inhibición de la fosforilación de pRB mediada por ciclina-D-CDK4 y ciclina-D-CDK6 (Stewart *et al.*, 2003).

Un estrés genotóxico también origina vías de activación de puntos de control que inician una detención del ciclo celular en la fase G2. Después de un daño al ADN, la señalización dependiente de ATM (ataxia telangenesica mutada) y ATR (ATM y Rad 3) induce detención en la fase G2 por inhibición de CDK1. La proteína ATM activa a la cinasa ChK2 en células que son expuestas a radiación ionizante mientras que ATR regula la activación de ChK1 en células tratadas con radiación ultravioleta (Abraham, 2001).

El punto de control del huso mitótico monitorea la estructura de los microtúbulos y el acoplamiento de los cromosomas al huso retrasando su segregación durante la anafase hasta que los defectos en los microtúbulos son corregidos. Las proteínas asociadas al

cinetocoro (MAD2, BUBR1, BUB1 y BUB3) son las que constituyen el punto de control de huso mitótico. MAD2 y BUBR1 regulan la progresión mitótica por una interacción directa e inhibición de la maquinaria de APC (supresor tumoral), lo cual previene la entrada a la anafase en presencia de una disfunción del huso mitótico. BUB1 y BUB3; también regulan una detención mitótica después de una alteración de los microtúbulos (Musacchio y Hardwick, 2002).

Las alteraciones en los componentes del ciclo celular y las vías de señalización para los puntos de control ocurren en muchos tumores humanos. Últimamente, se sabe que esas modificaciones genéticas resultan en la desregulación de oncogenes y genes supresores tumorales, los cuales tienen importantes implicaciones para la optimización de los regímenes terapéuticos actuales y la selección de nuevos blancos en el ciclo celular (Stewart *et al.*, 2003).

La regulación del ciclo celular por la proteína supresora tumoral pRB juega un papel integral en la prevención de tumores humanos, ya que las alteraciones oncogénicas en ciclinas, CDK y otros reguladores de pRB, río arriba ocurren en una gran variedad de tumores, incluyendo cánceres de mama y pulmón, retinoblastoma y osteosarcoma. En tumores con un gen que codifica para pRB normal, las modificaciones en los componentes de las vías de señalización que regulan a pRB son frecuentes, tales como niveles incrementados de ciclinas D y E, amplificación de los genes que codifican para CDK4 y CDK6 y delección de p16 (Zheng y Lee, 2001). Por ejemplo, aproximadamente el 50 % de los cánceres invasivos de mama tienen una expresión elevada de ciclina-D, comparada con el epitelio normal circundante (Stewart *et al.*, 2003). Similarmente, la amplificación de genes que codifican para CDK4 y CDK6 se presentan en sarcomas, gliomas, melanomas y cánceres de mama (Elsayed y Sausville, 2001).

Las alteraciones de genes que codifican para moléculas participantes en la señalización de los puntos de control en el ciclo celular son muy comunes en tumores humanos, en los cuales la mutación del gen p53 (supresor tumoral) es la lesión genética más frecuentemente observada (Stewart y Pietenpol, 2001). La importancia de la señalización dependiente de p53 en la supresión tumoral es subrayada por el hecho de que

mutaciones germinales de p53 resultan en el síndrome Li Fraumeni, un síndrome familiar altamente asociado con una incidencia incrementada de tumores de cerebro, cánceres de mama y sarcoma (Ozbun y Butel, 1995). En tumores humanos en los que p53 es normal, la función de esta molécula puede ser modificada por alteraciones en proteínas celulares que modulan la expresión, localización y actividad de la proteína P53.

Durante el crecimiento normal celular la proteína Mdm2 (producto de un oncogene) se une a p53 y lo marca para una degradación por ubiquitinación. En algunos tumores con p53 normal, el gen que codifica para Mdm2 es amplificado, lo que resulta en una sobreexpresión de Mdm2 y la inactivación permanente de p53 (Stewart *et al.*, 2003).

Las modificaciones en la función de inhibidores de CDK son comunes en tumores humanos. La proteína p27 está frecuentemente expresada de una forma aberrante en cánceres de mama; por otra parte, bajas concentraciones de p27 son asociadas con tumores más agresivos (Stewart *et al.*, 2003). De la misma forma un decremento en la expresión de p57 están relacionadas en cánceres de vejiga (Oya y Schulz, 2000) y la disminución de p15 y p16 o su inactivación por metilación está ligada a la patogénesis de melanomas humanos, linfomas, mesoteliomas y cánceres pancreáticos (Elsayed y Sausville, 2001)

Las mutaciones en otros componentes de las vías asociadas con la respuesta a un daño al ADN pueden guiar a una tumorigénesis aumentada; por ejemplo, las mutaciones en ATM en ataxia telangéctica, un padecimiento familiar asociado con una incidencia elevada de leucemias, linfomas y cáncer de mama (Khanna, 2000). Las mutaciones de ChK1 y ChK2 también están presentes en cánceres humanos, las mutaciones en ChK2 están reportadas en cáncer de pulmón (Matsuoka *et al.*, 2002), mientras mutaciones en ChK1 son observadas en cánceres de colon y endometrio (Stewart *et al.*, 2003).

La alteración en los puntos de control de los microtúbulos también está ligada a la patogénesis de varios tumores humanos. En células de carcinoma de colon han sido identificadas mutaciones en BUB1, lo que facilita su transformación (Cahill *et al.*, 1999).

En general, se ha observado que las alteraciones en los genes y proteínas que regulan la progresión del ciclo celular está directamente relacionada con la mayoría de los

cánceres, pero paradójicamente este punto de desregulación a últimas fechas ha sido motivo de estudio como blanco para encontrar nuevas moléculas que mediante su interacción con estas moléculas eventualmente lleven a las células a su muerte y que puedan diferenciar entre las normales y las tumorales.

1.3 Muerte celular

La omisión o represión de la muerte celular es de suma importancia en la iniciación y desarrollo del cáncer.

La alteración o bloqueo de los mecanismos de transducción juega un papel muy importante en el proceso de la oncogénesis, así la resistencia a la muerte permite la selección de clonas cuyas necesidades vitales a factores de crecimiento externos, nutrientes y señales contacto-dependientes progresivamente disminuyen y así se incrementa la autonomía de las células tumorales, lo que les permite dispersarse y generar metástasis a lugares a los cuales normalmente no podrían subsistir.

Por otro lado, con la terapia convencional mediante agentes quimioterapéuticos o radiación ionizante se propone eliminar a las células tumorales, usualmente iniciando un programa bioquímico de muerte latente en la célula; pero, en general, sucede que después de una respuesta inicial, células tumorales resistentes son seleccionadas y escapan a esta muerte, con la subsiguiente falla terapéutica.

Las vías de muerte celular pueden ser distintas y de acuerdo a criterios morfológicos, puede dividirse en apoptosis, muerte celular autofágica, por catástrofe mitótica y oncosis. (Jaattela, 2004). Aunque la clasificación podría ir más allá, si se considera que un solo estímulo puede ocasionar diferentes formas de muerte celular, dependiendo del contexto en el que se encuentre la célula (Melino y Nicotera, 2004).

Durante los últimos años se ha descubierto que diferentes organelos pueden participar en la muerte celular a dos niveles, uno en el que el organelo sufre un daño

primario por un agente físico o químico y otro en el que el organelo interviene directamente en la señalización que dirige a la muerte o a su ejecución; por lo que una mejor clasificación de muerte celular sería aquella que esté de acuerdo con el papel que juegan los compartimentos celulares.

Aunque la mayoría de los autores clasifican a la muerte celular programada de acuerdo a la morfología del núcleo celular dentro de las siguientes subclases (Leist y Jaattela, 2001): a) Apoptosis clásica, caracterizada por una cromatina condensada a compactada y en forma de figuras geométricas; b) Muerte celular programada semejante a apoptosis, con masas de cromatina menos compactas y condensadas; c) Muerte celular programada semejante a necrosis. Ocurre en ausencia de condensación en la cromatina o con cromatina formando agregados. Es claro que en la mayoría de los modelos de muerte celular programada, la permeabilización de la membrana mitocondrial (PMM) es el evento que define el punto de no regreso.

Los eventos que se llevan al cabo antes de la permeabilización de la membrana mitocondrial (río arriba) son numerosos y generalmente están controlados por los miembros de la familia Bcl2 y dependiendo de qué miembros de esta familia sean activados después del estímulo, depende el tipo de muerte celular que podrían desencadenar (Jäattela, 2004), aunque moléculas como el ácido araquínico y el calcio pueden inducir un daño mitocondrial aun en ausencia de las proteínas proapoptóticas de la familia Bcl2.

Cuando la PMM es limitada a la membrana externa, es suficiente para la liberación de moléculas promotoras de muerte del espacio intermembranal de la mitocondria, lo que genera una apoptosis clásica, mientras que la permeabilización de ambas membranas normalmente resulta en una muerte celular programada, semejante a necrosis, caracterizada por la pérdida del potencial transmembranal de la mitocondria y perturbaciones metabólicas mayores, debido a la generación reducida de ATP y a un incremento en la producción de especies reactivas de oxígeno (Jäattela, 2004).

El daño mitocondrial también puede generar un secuestro de la misma mitocondria en vacuolas autofágicas (Tolkovsky *et al.*, 2002). Si el daño es limitado, la autofagia puede servir como un mecanismo de rescate, inhibiendo una mayor liberación al citosol de

proteínas mitocondriales promotoras de muerte; sin embargo, en el caso de un daño continuo o más severo, la autofagia dirige a la célula a una muerte metabólica después de una fase lag de varios días (Jaattela, 2004).

Existen ciertos casos donde la mitocondria no tiene un papel regulatorio, pero otros organelos como los lisosomas y el retículo endoplásmico pueden ser los encargados de la muerte de la célula (Elliot *et al.*, 1999; Nylandsted *et al.*, 2002).

1.4 Terapia del cáncer

Los tratamientos convencionales del cáncer incluyen la cirugía, la radiación y la quimioterapia.

La cirugía es usada para la resección del tumor. Es la terapia más ampliamente usada, pero sus desventajas incluyen el posible daño (generalmente inevitable) a tejidos sanos u órganos (tales como nódulos y linfoides) y la imposibilidad de remover células metastásicas o tumores no visibles a las cirugías; además, la cirugía puede activar una mayor proliferación de tumores pequeños en estado de latencia (Koehnlechner, 1987).

La radiación (rayos X ó gama) de un tumor canceroso para causar la muerte de sus células, preserva las estructuras anatómicas circundantes y también destruye células cancerosas no visibles. El tratamiento con radiación tiene algunos efectos colaterales (como neurotoxicidad en niños), pero los pacientes se recuperan más rápido que de una cirugía; otros efectos colaterales incluyen la debilitación del sistema inmune y el reemplazo del tejido normal dañado por tejido conectivo (Koehnlechner, 1987).

La quimioterapia está basada en la administración sistemática de fármacos que viajan a través del cuerpo vía el torrente sanguíneo. En esencia la quimioterapia permite eliminar todas las colonias cancerosas dentro del cuerpo del paciente, incluyendo a las metastásicas; sin embargo, la mayoría de los cánceres más comunes no son curables únicamente con la quimioterapia. Esta clase de tratamiento también tiene muchos efectos colaterales tales como nauseas, anemia, debilitación del sistema inmune, diarrea, vómito y

pérdida del cabello, además, las células cancerosas pueden desarrollar resistencia a los agentes quimioterapéuticos (Koehnlechner, 1987 y Barbounaki y Konstantakou, 1989).

La quimioterapia es el campo más rápidamente desarrollado para el tratamiento del cáncer con nuevos compuestos constantemente probados y tamizados. Éstos incluyen metabolitos de plantas, compuestos sintéticos o semisintéticos y reguladores del sistema endocrino.

Los compuestos quimioterapéuticos son clasificados en diez grupos generales (Kintzios, 2004):

1. Antimetabolitos. Actúan como análogos no funcionales de metabolitos esenciales en la célula, bloqueando con esto las funciones fisiológicas del tumor.
2. Agentes alquilantes. Se unen químicamente con el ADN a través de grupos alquilo, con lo que inhiben la estructura de los genes y su función, o se unen a proteínas inhibiendo así a las enzimas.
3. Inhibidores de la topoisomerasa. Inhiben la replicación del ADN en células de rápida división como es el caso de las células tumorales.
4. Alcaloides de plantas. También inhiben la división celular al bloquear la despolimerización de los microtúbulos, un paso esencial para la segregación de los cromosomas durante la mitosis; sin embargo, otros alcaloides pueden actuar por otros mecanismos.
5. Antibióticos. Son derivados de diversos grupos de microorganismos o sintetizados. Estos bloquean la replicación de ADN y las síntesis de proteínas.
6. Antraciclinas. Son un grupo de antibióticos asociados con efectos tóxicos considerables sobre el corazón y la médula ósea.
7. Enzimas. En particular las proteolíticas, fibrinolíticas y los inhibidores de las tirosin-cinasas.
8. Hormonas. Son sustancias que interfieren con otros agentes quimioterapéuticos por regulación del sistema endócrino. Éstas encuentran una aplicación especial contra carcinomas de mama, próstata y endometrio.

9. Inmunomoduladores. Actúan al inhibir la proliferación tumoral a través de la estimulación del sistema inmune del huesped.

10. Sustancias Varias.- Las sustancias que no entran en las categorías mencionadas anteriormente.

Tabla 1. Algunos de los compuestos comúnmente usados en la quimioterapia del cáncer.

Clase	Compuesto
Antimetabolitos	Azatioprina Citosina arabinósido 5-Fluorouracilo 6-Mercatopurina 6-Tioguanina Metotrexato Hidroxiurea
Agentes alquilantes	Busulfan Clorambucilo Ciclofosfamida Ifosfamida Clorhidrato de Melfalan Clorhidrato de Micloretamina Nitrosoureas Lomustina Carmustina Estreptosocina
Inhibidores de topoisomerasas	Amsacrina
Alcaloides de plantas	Etopósido Tenipósido Vinblastina Vincristina Vindisina
Antibióticos	Bliomicina Plicamicina Mitomicina Dactinomicina
Antraciclinas	Daunorobicina Clorhidrato de Doxorubicina

	Rubidazona Idarubicina Epirubicina (en investigación) Clorhidrato de Aclarubicin
Enzimas	L-asparaginasa Inhibidores de la tirosin-cinasa
Hormonas	Adrenocorticoides Estrógenos Antiandrógenos Análogos de la hormona leuteinizante Progestógenos Antiestrógenos Inhibidores de la aromatasa
Inmunomoduladores	Interferones Interleucinas
Varios	Cisplatino Dacarbacina Procarbacina Mitoxantrona

Uno de los principales problemas de la quimioterapia es la resistencia que presenta el tumor al tratamiento. Generalmente, los pacientes que manifiestan una regresión inicial inducida por fármacos, muchas veces no responden a una segunda dosis de los mismos fármacos. Las células que sobreviven a la primera dosis desarrollan resistencia a los compuestos utilizados por varios mecanismos.

Un caso es aquel en el que las células sufren una selección natural donde unas cuantas que sobreviven al tratamiento pueden multiplicarse en presencia del compuesto que destruyó al resto de la población (Kintzios, 2004).

Otro método de resistencia es aquel en el que se produce la amplificación de genes, donde en las células se multiplica el número de genes que codifican para la proteína o compuesto que inhibe el fármaco. Este es el caso de la resistencia a metrotrexato en células de leucemia, donde la enzima de dihidrofolato-reductasa es el blanco del fármaco,

pues se ha observado que las células de leucemia tienen aproximadamente 100 veces más genes que codifican para dicha enzima que en una célula normal (Kintzios, 2004).

El fenómeno a la inversa (síntesis disminuida), también puede ser un mecanismo de resistencia, como se ha observado en el caso de resistencia a 5-Fluorouracilo, donde la enzima que convierte a este compuesto al nucleótido activo no es sintetizada (Boehm, *et al.*, 1997).

El mecanismo de resistencia más conocido es aquel en el que el compuesto es excluido de su sitio de acción por parte de la glicoproteína P que funciona como una bomba que lo expulsa al exterior de la célula, aunque para algunas tetraciclinas se ha observado que el mecanismo de resistencia por parte de la célula es debido a una alteración en la permeabilidad de la membrana, lo que no permite se acumulen dentro de la célula (Higgins, *et al.*, 2001).

1.5 Descubrimiento de nuevos fármacos citotóxicos

Fases preclínicas

Las pruebas preclínicas comprenden la evaluación de la citotoxicidad de un compuesto que es candidato como anticancerígeno *in vitro* mediante el uso de líneas celulares tumorales cultivadas en un medio de cultivo bajo condiciones controladas (Kintzios y Barberaki, 2004). Los ensayos con líneas celulares están arrojando gran cantidad de compuestos con actividad citotóxica (Trisha, 1997) y además proveen información valiosa sobre los mecanismos moleculares. Además, al contar con una base de datos que se enriquece con cada nuevo compuesto descubierto, se puede buscar un patrón estructural y mecanístico del compuesto, lo que brinda la posibilidad de crear grupos farmacofóricos y diferentes mecanismos de acción y a través de este programa, se reduce considerablemente la cantidad de compuestos que pueden ser llevados a fases clínicas (Weinstein *et al.* 2004).

El tamizaje convencional se puede aplicar sin información estructural previa, por lo que puede llegar a ser empírico; además, se puede aplicar a cualquier molécula y blanco molecular, por lo que el grado de éxito es aceptable. Por otro lado, está el diseño racional

donde la especificidad del fármaco se diseña previamente con base a conocimientos estructurales previos, lo cual está limitado por los programas de cómputo y cómo el tipo de ensayo para estos compuestos se basa en restaurar o eliminar un blanco molecular específico; el éxito es limitado (Bevan *et al.*, 1995).

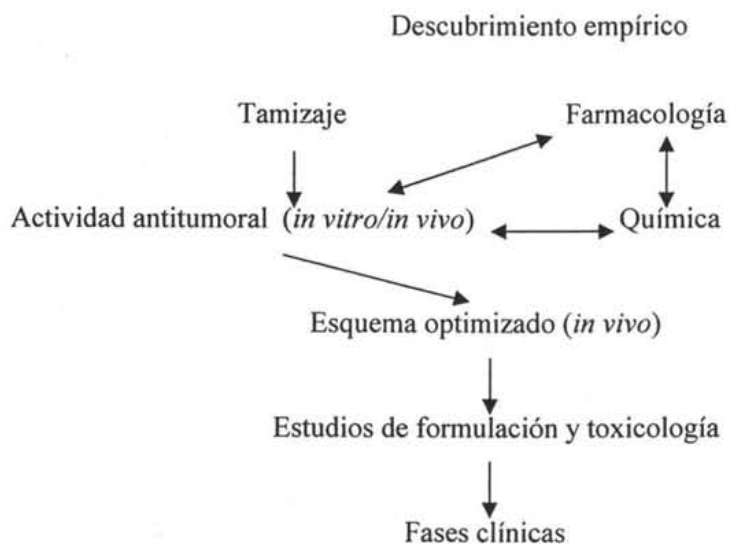


Figura 1. Fases del desarrollo preclínico de un compuesto citotóxico mediante un descubrimiento empírico (Ojima, 2001).

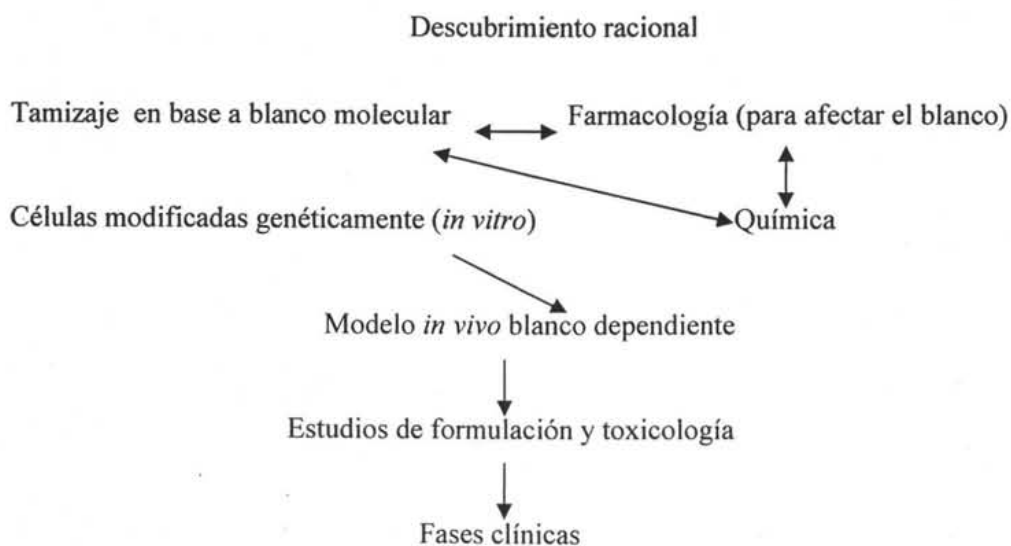


Figura 2. Fases del desarrollo preclínico de un compuesto citotóxico mediante un descubrimiento racional (Ojima, 2001).

Fases clínicas

Las fases clínicas son estudios que evalúan la efectividad de nuevas moléculas. En el ámbito de la quimioterapia del cáncer existen diferentes tipos de fases clínicas, las que incluyen:

- Fases diseñadas para prevenir que el cáncer se desarrolle en gente que ha padecido cáncer previamente.
- Fases diseñadas para prevenir que un nuevo tipo de cáncer se desarrolle en gente que ha padecido cáncer.
- Fases de temprana detección para diagnosticar cáncer en sus estadios tempranos
- Fases de tratamiento para probar nuevas terapias en personas con cáncer.
- Estudios de calidad de vida para mejorar la calidad de vida en gente con cáncer.
- Estudios que evalúan las formas de modificar comportamientos que causan cáncer.

Muchas investigaciones clínicas que se involucran al probar un nuevo compuesto progresan en una serie de fases ordenadas que permite a los investigadores obtener información acerca del compuesto y sus efectos en los pacientes.

Fase clínica I

Los primeros estudios en las personas evalúan cómo un compuesto puede ser administrado (vía oral, intravenosa o por inyección), cada cuánto y qué dosis. Un estudio en esta fase, usualmente requiere en número pequeño de pacientes voluntarios sanos (de 20 a 80). La prueba estudia el perfil de seguridad del compuesto incluyendo su margen de seguridad; los estudios también determinan cómo el compuesto es absorbido, distribuido, metabolizado y excretado, además de la duración de su acción. Esta fase dura aproximadamente 1 año.

Fase clínica II

Estos estudios proveen una información preliminar de cómo está actuando un nuevo compuesto, de su seguridad y los beneficios. Cada estudio en esta fase usualmente se

enfoca sobre un tipo particular de cáncer; se lleva a cabo en aproximadamente 100 a 300 voluntarios enfermos y dura cerca de 2 años.

Fase clínica III

En esta fase se compara un nuevo fármaco, la combinación de varios o sus procedimientos de administración con un estándar usado. Típicamente involucran a un gran número de personas (1000 a 3000) en clínicas, institutos y hospitales. Esta fase dura aproximadamente 3 años, durante los cuales se realiza un monitoreo a los pacientes para determinar la eficacia del fármaco e identificar efectos adversos.

Fase clínica IV

En esta fase se continua con la evaluación del fármaco, una vez que éste ha salido a la venta.

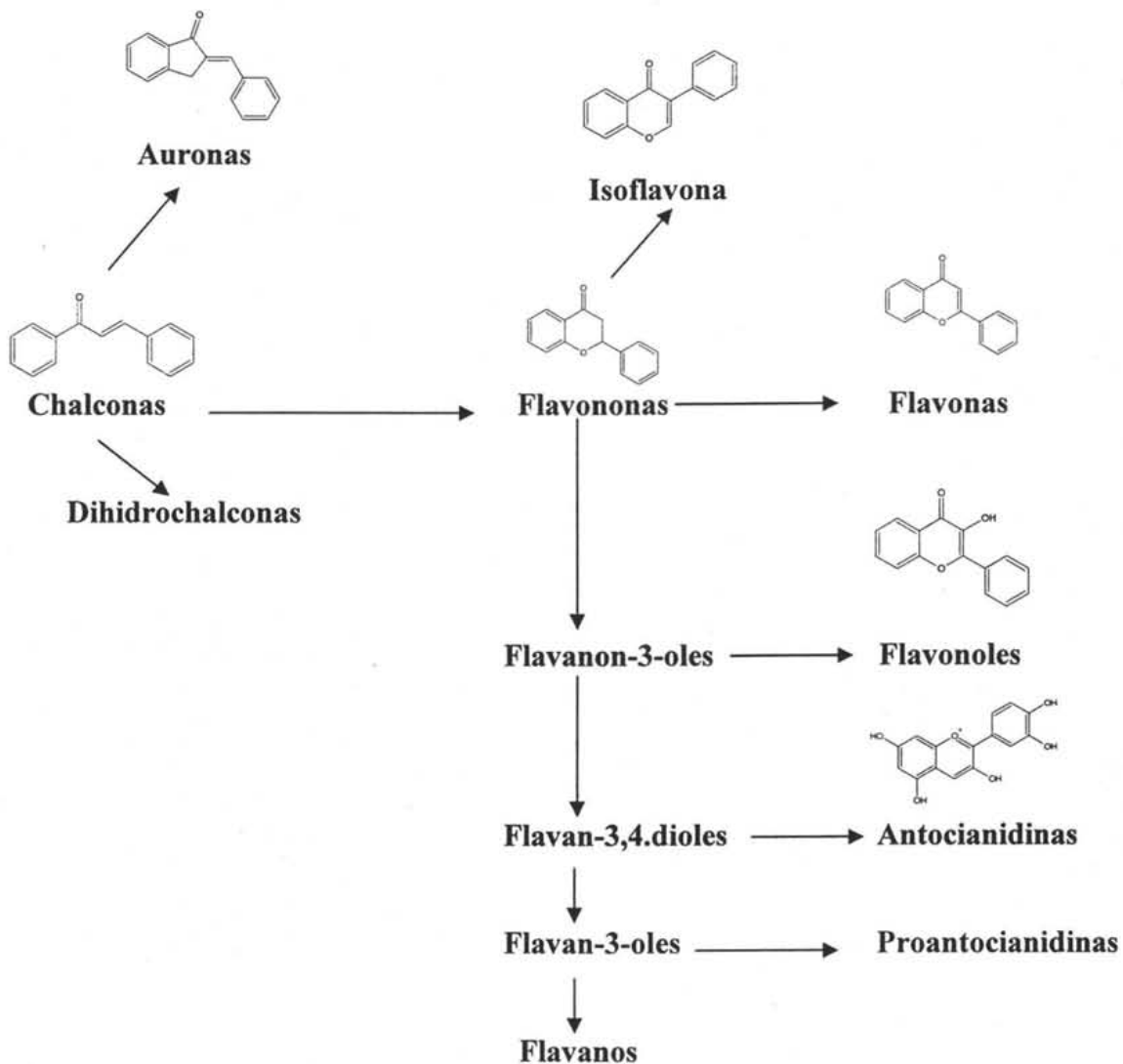
1.6 Chalconas

Las chalconas son consideradas como los precursores de los flavonoides e isoflavonoides; son abundantes en una gran variedad de plantas (esquema 1) y químicamente presentan en su estructura dos anillos aromáticos unidos por un sistema carbonilo α , β -insaturado de tres carbonos (Ducki, 1997).

Las chalconas y demás flavonoides contribuyen al color y a la protección contra la radiación ultravioleta en las plantas, además de funcionar como funguicidas e insecticidas, juegan un papel muy importante en el proceso de señalización para la infección de las raíces de algunas legumbres por la bacteria *Rhizobium*, esencial en el proceso de fijación de nitrógeno (Jeffrey, 1999).

Los flavonoides y chalconas están presentes en una amplia variedad de frutos y vegetales que los humanos utilizan en su dieta, por lo que se ingiere al menos un gramo de estos compuestos diariamente (Jeffrey, 1999). Aunque no se sabe si estos compuestos son benéficos o no para el ser humano, está claro que son los componentes mayoritarios de una

gran variedad de plantas utilizadas como agentes antiinflamatorios y diuréticos en la medicina tradicional de algunos países (Ducki, 1997; Jeffrey, 1999).



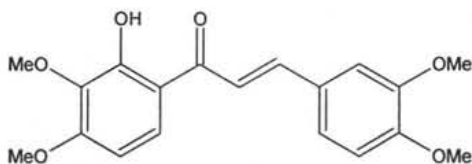
Esquema 1. Ruta biosintética de los flavonoides

1.6.1 Actividad Biológica de las Chalconas

Antiinflamatorios.- Los leucocitos juegan un papel muy importante en la defensa del huésped durante un ataque infeccioso, pero éstos a su vez pueden producir un importante daño celular durante condiciones inflamatorias a través de la degranulación, y la generación de especies reactivas y otros mediadores de inflamación (Hla y Nelson, 1992).

La inhibición de la función de los leucocitos y/o de la biosíntesis de mediadores de la inflamación, es promisoría para la terapéutica de padecimientos inflamatorios y puede ser guía para el descubrimiento de nuevos compuestos con menos efectos adversos que los antiinflamatorios convencionales (Bjorkman, 1996).

Se ha demostrado que la 2'-hidroxi-3',4',3,4-tetrametoxichalcona posee efectos antiinflamatorios, inhibiendo la generación de eicosanoides y liberación de elastasa por leucocitos humanos. (Ballesteros, 1995). Otros derivados de chalconas también son capaces de inhibir *in vitro* las funciones de los leucocitos, tales como la degranulación y la generación de especies reactivas de oxígeno y la producción de eicosanoides, mediante mecanismos que avalen la liberación de elastasa y LTB₄ en neutrófilos humanos estimulados, además de inhibir las enzimas 5-LO y COX-2 (enzimas involucradas en los procesos inflamatorios) (Herencia *et al.*, 1998).



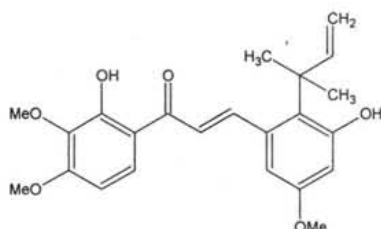
2'-hidroxi-3',4',3,4-tetrametoxichalcona

Los efectos antiinflamatorios de algunos derivados de chalconas también han sido demostrados en modelos *in vivo* en donde se ha observado que, después de dosis nanomolares, disminuye la infiltración de neutrófilos a la zona inflamada (Herencia *et al.*, 1998).

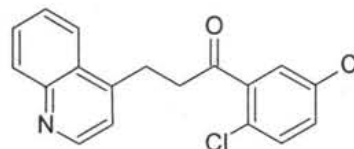
Antimaláricos.- Debido a que varias clases de fármacos antimaláricos utilizados actualmente, como la cloroquina y sus derivados han dejado de ser eficaces al generar resistencia en varias cepas de *Plasmodium falciparum* (parásito causante de la malaria), se ha incrementado la necesidad de buscar nuevos compuestos efectivos contra este parásito (Rongshi *et al.*, 1995).

Las chalconas han demostrado ser una nueva clase de compuestos con potencial antimalárico y su actividad fue observada inicialmente en la licochalcona A, un compuesto natural extraído de las raíces de la liquorice china (Rongshi *et al.*, 1995) y cuya estructura

se ha tomado como modelo para la síntesis de compuestos como la 1-(2,5-diclorofenil)-3-(4-quinolinil)-2-propen-1-ona con una IC50 de 200 nM contra cepas resistentes y cuyo mecanismo de acción propuesto es la inhibición en los parásitos de la enzima cistein-proteasa encargada de degradar la hemoglobina del huésped, que es el principal recurso de aminoácidos para que el parásito sobreviva (Rongshi *et al.*, 1995).

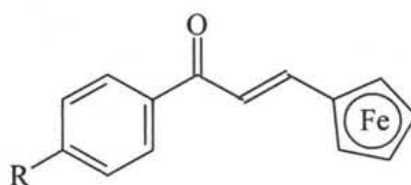


Licochalcona A



1-(2,5-diclorofenil)-3-(4-quinolinil)-2-propen-1-ona

Otra serie de chalconas sintéticas que han demostrado potencial antimalárico son aquellas que se encuentran alcoxiladas e hidroxiladas con valores de IC50 menores a 5 μ M (Mei *et al.* 2001). De la misma manera, una serie de ferrocenil-chalconas fueron sintetizadas y evaluadas para la actividad antimalárica *in vitro* mostrando valores de IC50 menores a 5 μ M (Xiang, 2002).

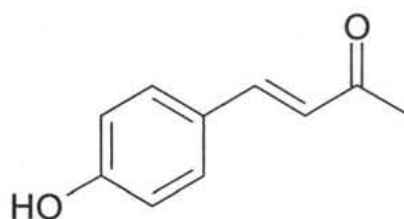


Ferrocenil-chalconas

Antileismánicas .- La terapia de pacientes con leishmania se encuentra en un serio problema debido a que los fármacos de primera elección son predominantemente compuestos de antimonio, los cuales requieren un tratamiento muy prolongado y tienen muchos efectos adversos; aunado a este problema, está el de la resistencia por parte de los parásitos a estos agentes. (Nielsen *et al.*, 1998). Hace algunos años fue descubierto que la licochalcona A inhibía eficientemente la proliferación de los parásitos de *Leishmania donovani* y *Leishmania major* al interferir con las funciones de su mitocondria, pero con el efecto adverso de inhibir a la fitohemaglutinina A y la proliferación de los linfocitos

humanos (Chen, 1993), por lo que se desarrolló una serie de chalconas con diferente patrón de sustitución a fin de que pudieran diferenciar su efecto sobre los parásitos y los linfocitos, obteniéndose resultados que muestran que derivados de chalconas con sustituyentes de gran tamaño en las posiciones 4', 2, 3 y 4, favorecen la disminución de la actividad contra los linfocitos, sin afectar su actividad contra los parásitos (Nielsen *et. al.*, 1995; Nielsen *et. al.*, 1998).

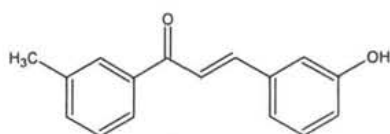
Inhibidores del crecimiento celular y antitumorales.- En la medicina tradicional china se ha usado el extracto seco de la planta *Scutellaria barbata* (Labiatae) como un agente antiinflamatorio, antiurético y antitumoral (Ducki *et. al.*, 1997) y de esta planta se aisló la cetona α , β insaturada (*E*)-1-(4'-hidroxifenil)but-1-en-3-ona (**1**) que al ser evaluada *in vitro* hacia la línea celular tumoral K562 mostró una actividad de IC50 de 60 μ M (Ducki, 1995).



(1)

Después de su aislamiento, este compuesto se ha utilizado como una molécula base para desarrollar otros compuestos con mayor actividad biológica como el compuesto (*E*)-1-(pentafluorofenil)but-1-en-3-ona con una IC50 de 1.8 μ M y 30 veces más activo que (**1**) (Ducki *et. al.* 1997)

Otro compuesto que también ha mostrado inhibir la proliferación de varias clases de células tumorales es la 3'-metil-3-hidroxichalcona, compuesto que además presenta actividad biológica *in vivo* suprimiendo la actividad promotora del 13-acetato de 12-O-tetradecanoilforbol sobre la carcinogénesis de piel en ratones (Satomi, 1993). Los compuestos derivados de chalconas han demostrado actividad quimiopreventiva para la carcinogénesis oral de ratas inducida por óxido de 4-nitroquinolina, causando una reducción en la frecuencia de carcinomas de lengua en un 68% (Makita, *et al.*, 1996).



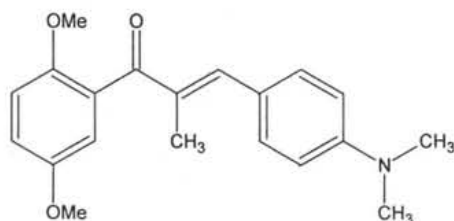
3'-metil-3-hidroxichalcona

En fechas recientes, se ha observado que algunos derivados de chalcona presentan actividad en contra de líneas celulares multiresistentes a fármacos (MDR) a concentraciones en el rango micromolar (De Vincenzo, 2000). Un ejemplo de estos compuestos son las 2'-aminochalconas, que estructuralmente son los análogos fragmentados de las 2-fenil-4-quinolonas, moléculas con actividad demostrada tanto *in vitro* como *in vivo* (Xia, 2000).

Son de particular interés las chalconas derivadas de ácido borónico cuya actividad antiproliferativa puede diferenciar entre células normales y tumorales, siendo de 6 a 9 veces menos tóxicas para las células normales a concentraciones micromolares (Srinivas, 2003).

1.6.2 Mecanismos de acción

Antimitóticos.- Una serie de chalconas fue evaluada como agentes antimitóticos y de esta serie el compuesto (*E*)-1-(2,5-dimetoxifenil)-3-[4-(dimetilamino) fenil]-2-metil-2-propen-1-ona resultó ser un agente antimitótico muy efectivo a una concentración de 4 nM en un sistema *in vitro* y además posee actividad antitumoral *in vivo* (Edwards *et. al.*, 1990).



(*E*)-1-(2,5-dimetoxifenil)-3-[4-(dimetilamino) fenil]-2-metil-2-propen-1-ona

Estudios posteriores revelaron que la actividad citotóxica de algunas chalconas correlaciona con su capacidad para unirse a la tubulina. Estos compuestos mostraron una unión a la tubulina competitiva con la colchicina, un compuesto antimitótico usado en el tratamiento terapéutico. Tal unión origina un patrón difuso en la organización de los microtúbulos indicativo de dímeros de tubulina dispersos y despolimerizados (Lawrence, 2000).

Moduladores de la multirresistencia a fármacos (unión a glicoproteína-P).- El desarrollo de la resistencia a fármacos es uno de los mayores impedimentos en la quimioterapia del cáncer.

La resistencia múltiple aparece después de una exposición prolongada de las células a un solo fármaco y está caracterizada por la resistencia a una serie de compuestos que no están relacionados estructuralmente y que tienen diferentes blancos celulares (Bois *et. al.*, 1998). La multirresistencia en las células cancerosas involucra la sobreexpresión de la proteína transmembranal Glicoproteína-P (Gottesman y Pastan, 1993). La Glicoproteína-P es una proteína transportadora que actúa como una bomba en presencia de ATP, expulsando una amplia gama de compuestos fuera de la célula, disminuyendo su concentración intracelular por debajo del umbral citotóxico (Higgins, 1992).

Los derivados halogenados de chalconas han demostrado actividad en este ámbito manifestando una unión a la Glicoproteína-P con gran afinidad en el rango nanomolar (Bois *et. al.*, 1998) y a recientes fechas otros derivados mostraron aumentar la citotoxicidad de la danorubicina en células K562 multirresistentes. Estos compuestos también fueron capaces de incrementar la acumulación intracelular de rodamina 123, una molécula fluorescente que actúa como marcador para demostrar multirresistencia dependiente de la Glicoproteína-P (De Vincenzo, 2000).

Inhibidores enzimáticos.- Las enzimas del citocromo-P450 (CYP450), activan metabólicamente un gran número de procarcinógenos a intermediarios reactivos que interactúan con nucleófilos celulares y, finalmente, promueven la carcinogénesis

(Guengerich, 1998). Se ha demostrado que algunas chalconas y sus derivados son potentes inhibidores de las enzimas del CYPIA *in vitro*, cuya inhibición correlaciona bien con los efectos quimiopreventivos de estos compuestos *in vivo*.

Antagonistas de las interacciones MDM2 y P53.- La oncoproteína MDM2 inhibe a la proteína P53 (supresor tumoral) al unirse a su dominio de transactivación. El gen de P53 es inactivado en muchos tumores humanos, ya sea por mutaciones o por la unión a proteínas oncogénicas. En algunos tumores, tales como el sarcoma de tejido blando la sobreexpresión de MDM2 inactiva otra clase de P53 intacto, desestabilizando la integridad de los checkpoints del genoma, permitiendo que progrese el ciclo celular de células defectuosas (Stoll, 2000). La interrupción de las interacciones MDM2/P53 incrementan los niveles de P53 y restauran la actividad transcripcional de esta molécula, lo que indica un potencial terapéutico de moléculas antagonistas de la unión MDM2/P53 (Stoll, 2000).

Se ha demostrado que las chalconas son inhibidores de MDM2 que se unen a un sustituto de la hendidura de la unión de P53 con MDM2, por lo que estos compuestos irrumpen el complejo protéico MDM2/P53, liberando P53 de estos complejos, por lo que éstos podrían ser utilizados en terapias contra tumores con niveles elevados de (Stoll, 2000).

Inhibidores de receptores a tirosincinasas del factor de crecimiento epidermal.-Las tirosincinasas son proteínas involucradas en la regulación de la proliferación y diferenciación celular (Ullrich y Schlessinger, 1990). La sobreexpresión de algunos receptores de factores de crecimiento con tirosincinasas ha sido encontrado en cánceres humanos, tales como el de mama e hígado (Yang, 1997). De esta forma, es que los inhibidores de las tirosincinasas son consideradas como una clase potencial de agentes para ciertos cánceres.

Las chalconas también han demostrado tener actividad inhibidora en las tirosincinasas *in vitro*, por ejemplo la buteina (IC₅₀ 8 μ M), la marcina (IC₅₀ 19 μ M) y la

floretina (IC50 25 μ M), con un mecanismo de acción sugerido por modelado molécula, ya que pueden anclarse al sitio de unión a ATP del receptor del factor de crecimiento epidermal (Yang, 2000).

El hecho de que este tipo de compuestos posean una gran variedad de actividades biológicas y habiendo observado que determinados sustituyentes en las estructuras pueden dar origen a diferentes actividades y citotoxicidad específica hacia células tumorales, da la pauta a este trabajo para realizar la síntesis de compuestos con estructura análoga como lo son las 2,6 diarilidenciclohexanonas.

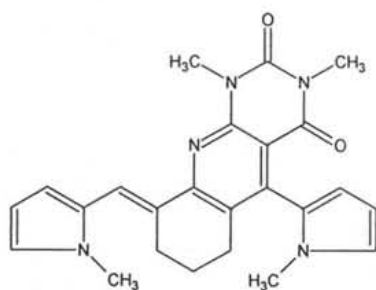
Actividad biológica de compuestos unidos a una base pirimídica.

Una serie de compuestos que contienen una base de pirimidina unida a un grupo fosfonilalquilo han mostrado una potente y selectiva actividad contra retrovirus de herpes (de Clercq, 1987). Adicionalmente, algunos análogos del antibiótico oxetanocina, también han mostrado actividad antiviral y citotóxica. Estos compuestos poseen grupos carbocíclicos unidos a una purina (adenina, 2,6-diaminopurina) o a una pirimidina (citosina, uracilo o timina) (Hayashi, 1990).

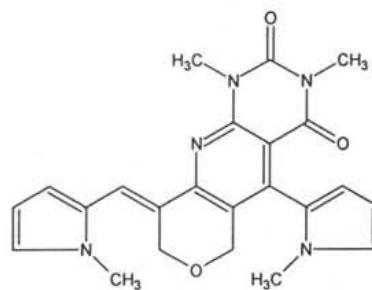
Por otra parte, Quintero y cols. (1999) demostraron que derivados pirimidínicos de lactonas sesquiterpénicas poseen actividad citotóxica contra una serie de líneas celulares tumorales.

Díaz y cols. (2000, 2002, 2003) han obtenido aductos de una serie de 2,6-diarilidenciclohexanonas con 6-amino-1,3-dimetiluracilo, demostrando la formación de un nuevo anillo donde los centros estereogénicos de los aductos obtenidos conservan la misma relación geométrica que el doble enlace de la materia prima (2,6-diarilidenciclohexanonas). Este nuevo tipo de compuestos tricíclicos han sido probados contra una serie de líneas celulares tumorales y se ha demostrado que dos de estos compuestos (JDS-I y JDS-II) con sustituyentes aromáticos heterocíclicos presentan citotoxicidad en un rango de concentraciones de 5 a 40 μ M (Solano y cols., 2004), por lo

que resulta interesante la síntesis y evaluación del efecto citotóxico de este tipo de nuevos compuestos con sustituyentes aromáticos heterocíclicos.



JDS-I



JDS-II

2 Objetivo e hipótesis

2.1 Objetivos generales

Sintetizar nuevas diarilidenciclohexanonas mediante la reacción de condensación de Claisen-Schmit y posteriormente, evaluar su actividad citotóxica en líneas celulares tumorales.

Llevar a cabo la reacción entre las diarilidenciclohexanonas y el 6-amino-1,3-dimetiluracilo, para posteriormente evaluar la actividad citotóxica de los productos obtenidos en líneas celulares tumorales.

2.1.1 Objetivos particulares

Caracterizar mediante técnicas espectroscópicas (RMN ^1H , masas e infrarrojo) los compuestos obtenidos.

Determinar el efecto de la dosis de cada compuesto en la proliferación de las diferentes líneas celulares.

Calcular la concentración a la que se inhibe el cincuenta por ciento de la proliferación celular (IC50).

Determinar la alteración de las diferentes fases del ciclo celular por el compuesto de mayor citotoxicidad

2.2 Hipótesis

Los compuestos 1,6-diarilidenciclohexanonas poseerán actividad citotóxica por la semejanza estructural con otras moléculas con actividad citotóxica como las chalconas. Además, los productos de reacción de las 1,6-diarilidenciclohexanonas con el 6-amino-1,3-dimetiluracilo pueden tener actividad biológica con base a resultados previos en los que moléculas con estructuras semejantes poseen actividad citotóxica.

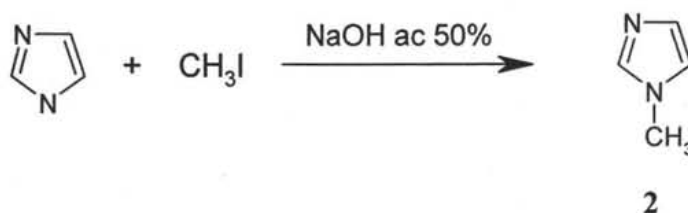
3. Resultados

3.1 Parte química

Con el fin de contar con nuevas moléculas con actividad citotóxica contra líneas celulares provenientes de tumores humanos se sintetizaron nuevas 2,6-diarilidenciclohexanonas (**5-12**), así como sus compuestos de adición a 6-amino-1,3-dimetiluracilo (**13-17**).

Los compuestos **5** a **17** se obtuvieron siguiendo las rutas sintéticas que se muestran en los Esquemas 5, 6, 7 y 8. Los compuestos se obtuvieron como sólidos con punto de fusión definido y la mayoría de las reacciones procedieron con rendimientos satisfactorios en el caso de las 2,6-diarilidenciclohexanonas y de regulares en el caso de los compuestos tricíclicos. Los rendimientos y puntos de fusión se muestran en las Tablas 3 y 4.

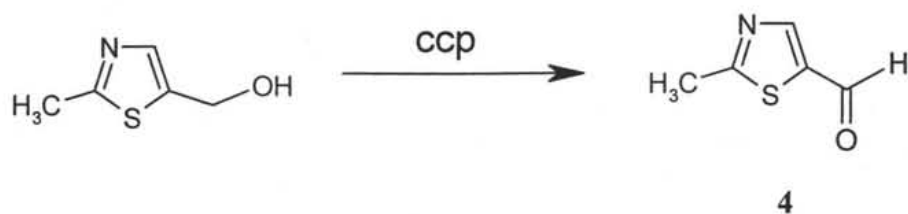
Las constantes espectroscópicas y espectrométricas de los compuestos **5** a **17** se presentan en la Tabla 6, las señales obtenidas corresponden a las señales esperadas para cada compuesto.



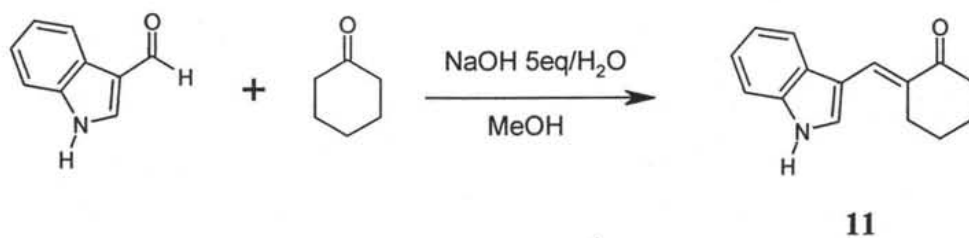
Esquema 2. Síntesis del N-metilimidazol (**2**)



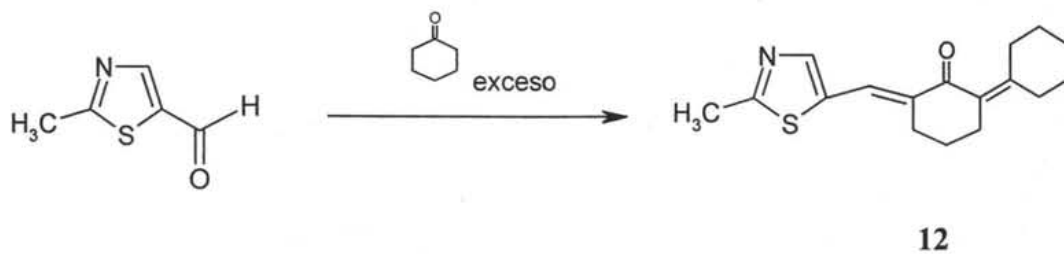
Esquema 3. Síntesis del 1-metil-5-formiltiazol (**3**)



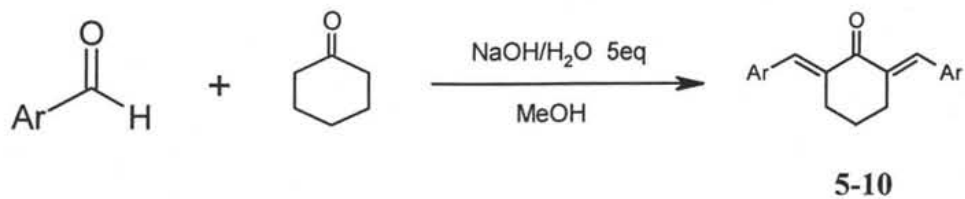
Esquema 4. Síntesis del 2-metil-5formiltiazol (4)



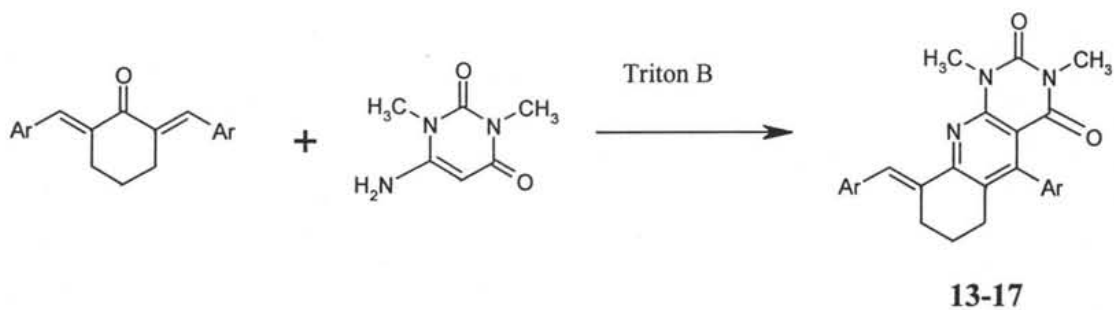
Esquema 5. Síntesis de la (2E)-2-(1H-Indol-2-iliden)ciclohexanona (11)



Esquema 6. Síntesis de la (3E)-3-(5-Metil-1,3-tiazol-2-iliden-1,1'-bi(ciclohexan)-6-en-2-ona (12)



Esquema 7. Síntesis de los compuestos **5-10**



Esquema 8. Síntesis de los compuestos **13-17**.

TABLA 2. Propiedades físicas de las 2,6-diarilidenciclohexanonas obtenidas.

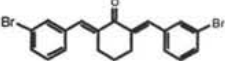
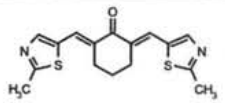
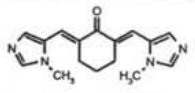
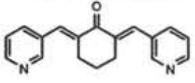
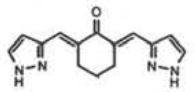
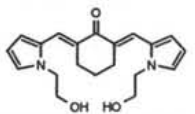
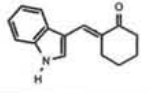
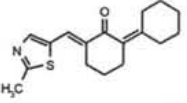
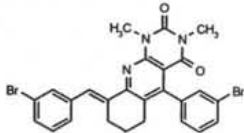
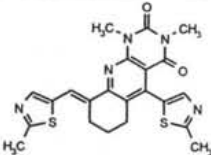
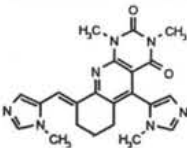
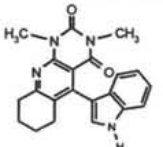
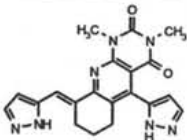
No	Molécula	Aspecto	p.f. °C	Rendimiento %	Recristalización
5		Cristales color amarillo pálido	122-124	86	CH ₂ Cl ₂ /hexano
6		Cristales color amarillo	218-222	89	MeOH/hexano
7		Cristales color amarillo	258-260	78	MeOH/hexano
8		Cristales Color blanco	242-244	76	CH ₂ Cl ₂ /hexano
9		Cristales color amarillo pálido	244-248	86	CH ₂ Cl ₂ /hexano
10		Cristales color rojo	140-142	89	MeOH/hexano
11		Cristales Color anaranjado	248-250	94	CH ₂ Cl ₂ /hexano
12		Cristales color amarillo	190-192	85	CH ₂ Cl ₂ /hexano

TABLA 3. Propiedades físicas de los productos de reacción de las 2,6-diarilidenciclohexanonas con 6-amino-1,3-dimetiluracilo.

No	Molécula	Aspecto	p.f. °C	Rendimiento %	Recristalización
13		Cristales color amarillo pálido	226-230	22	MeOH/hexano
14		Cristales color amarillo	266-270	32	MeOH/CH ₂ Cl ₂ /hexano
15		Cristales color amarillo	258-260	29	MeOH/CH ₂ Cl ₂ /hexano
16		Cristales color amarillo pálido	338	20	MeOH/hexano
17		Cristales color amarillo	275-278	12	MeOH/hexano

3.2 Parte biológica

Con el objeto de determinar la citotoxicidad de los compuestos se utilizaron la serie de las ocho diarilidenciclohexanonas (compuestos 5-12) y cinco compuestos derivados de uracilo (compuestos 13-17). La evaluación se llevo al cabo en las líneas celulares previamente descritas a concentraciones de 5, 20, 40 y 80 μ M mediante la técnica de MTT utilizando como control negativo células incubadas en ausencia de los compuestos y el control del disolvente utilizado (DMSO).

Los resultados muestran que la mayoría de las diarilidenciclohexanonas presentaron actividad citotóxica a las concentraciones utilizadas y en general se observa un efecto dosis dependiente (Figuras 5-a, 5-b, 6-c, 6-d, 7-e).

El compuesto **9** fue el más activo para las líneas celulares K562, SW480, HeLa y C33 alcanzando un porcentaje máximo de inhibición de la proliferación celular a una concentración de 40 μ M en todos los casos (Figuras 5-a, 5-b, 6-c, 6-d, 7-e). El compuesto que le siguió en actividad fue el compuesto **5** con porcentajes de inhibición que van desde 1 (en SW480) hasta 7.5 veces (en K562) menores a los del compuesto **9** este compuesto **5** fue el más activo para la línea celular MCF7 alcanzando un porcentaje máximo de inhibición de la proliferación celular a una concentración de 40 μ M, porcentaje 1.3 veces mayor que el de **9**. Dentro de la serie de diarilidenciclohexanonas sintetizadas se observa también que los compuestos con un menor porcentaje de inhibición fueron el **8** y **11**.

Por lo que respecta a los compuestos de adición (13-17) se observa que a excepción del **14** que alcanzó porcentajes de inhibición mayores al 50% ninguno presentó una actividad citotóxica significativa (>50%) a las concentraciones utilizadas en los ensayos (figuras 5-a, 5-b, 6-c, 6-d, 7-e).

Comparando los valores de IC₅₀, el compuesto **9** fue el compuesto más activo para las líneas celulares HeLa, K562, MCF7, C33 y SW480 con valores de IC₅₀ de 19,15.5, 47.2, 16.6 y 21.5 respectivamente (Tabla 5) siendo la línea K562 la más sensible y la MCF7 la más resistente. El compuesto que le siguió en actividad fue el **5** con valores de IC₅₀ de 28.8, 59.6, 45.7, 30.8 y 26.7 para las líneas celulares HeLa, K562, MCF7, C33 y SW480 respectivamente (Tabla 5), siendo la línea HeLa la más sensible y la K562 la más resistente. Dentro de la serie de diarilidenciclohexanonas sintetizadas también se observa que los compuestos menos activos fueron el **8**, **10** y **11** (tabla 5) los cuales presentaron una IC₅₀ mayor a los rangos de concentración utilizados, a excepción de **10** en la línea C33 con una IC₅₀ de 66.58.

Los compuestos de adición **13**, **15**, **16** y **17** fueron en general los compuestos menos activos y su IC₅₀ fue mayor al rango de concentraciones utilizadas siendo el compuesto **14** el único producto de adición más activo alcanzando valores de IC₅₀ de 52.0, 45.5, 76.0, 66.0 y 62.9 en las líneas celulares HeLa, K562, MCF7, C33 y SW480, respectivamente.

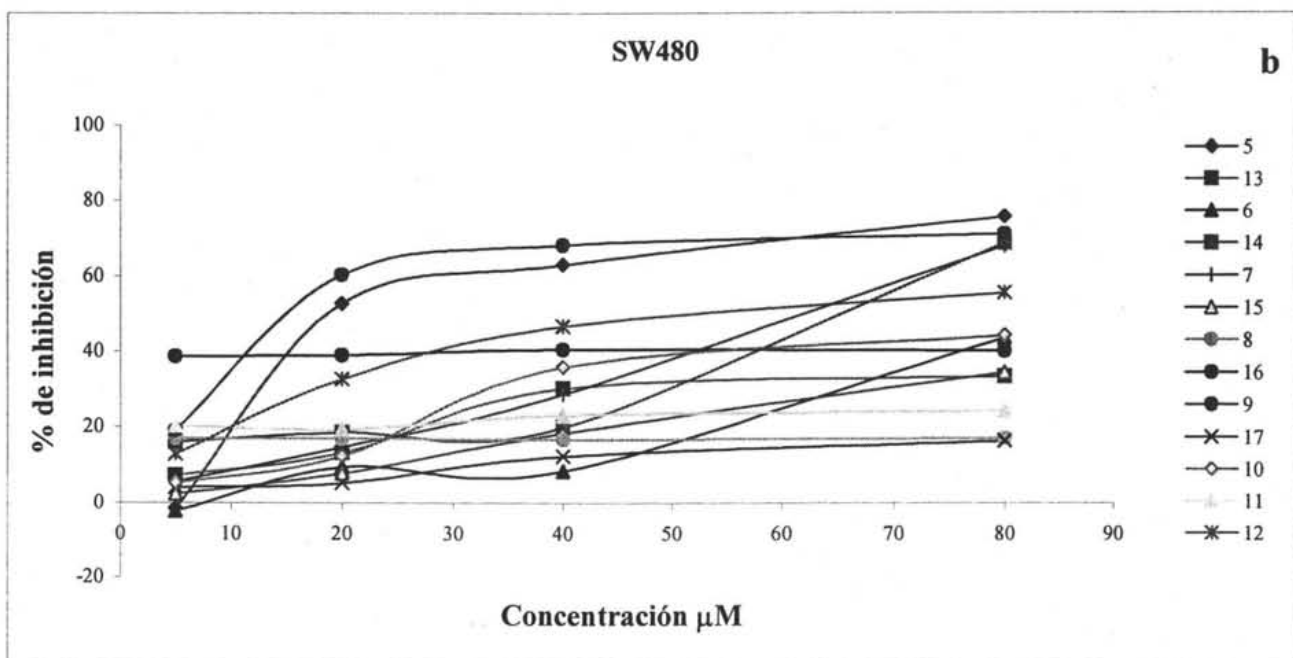
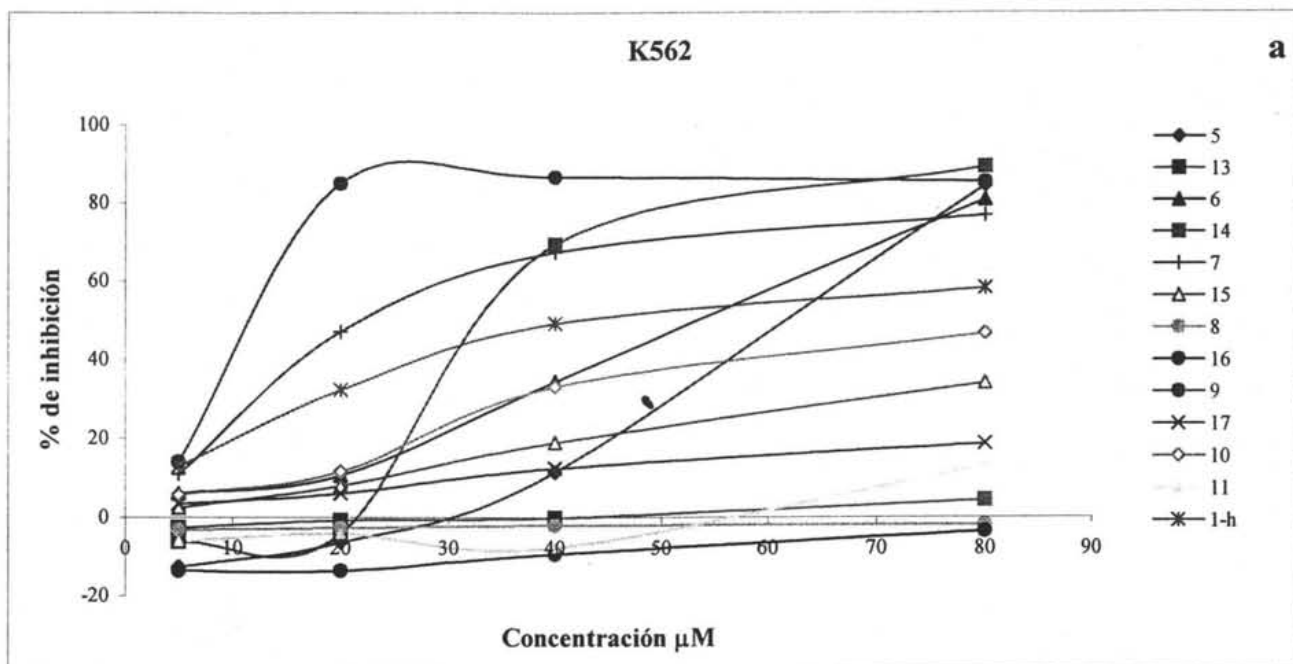


Figura 5. Citotoxicidad de los compuestos **5** a **17** en las líneas celulares (a) K562 y (b) SW480. Los compuestos fueron probados a las concentraciones de 5, 20, 40 y 80 μM durante 72 horas como se indica en la parte experimental. Los resultados son el promedio de tres experimentos independientes, los cuales se hicieron por sextuplicado.

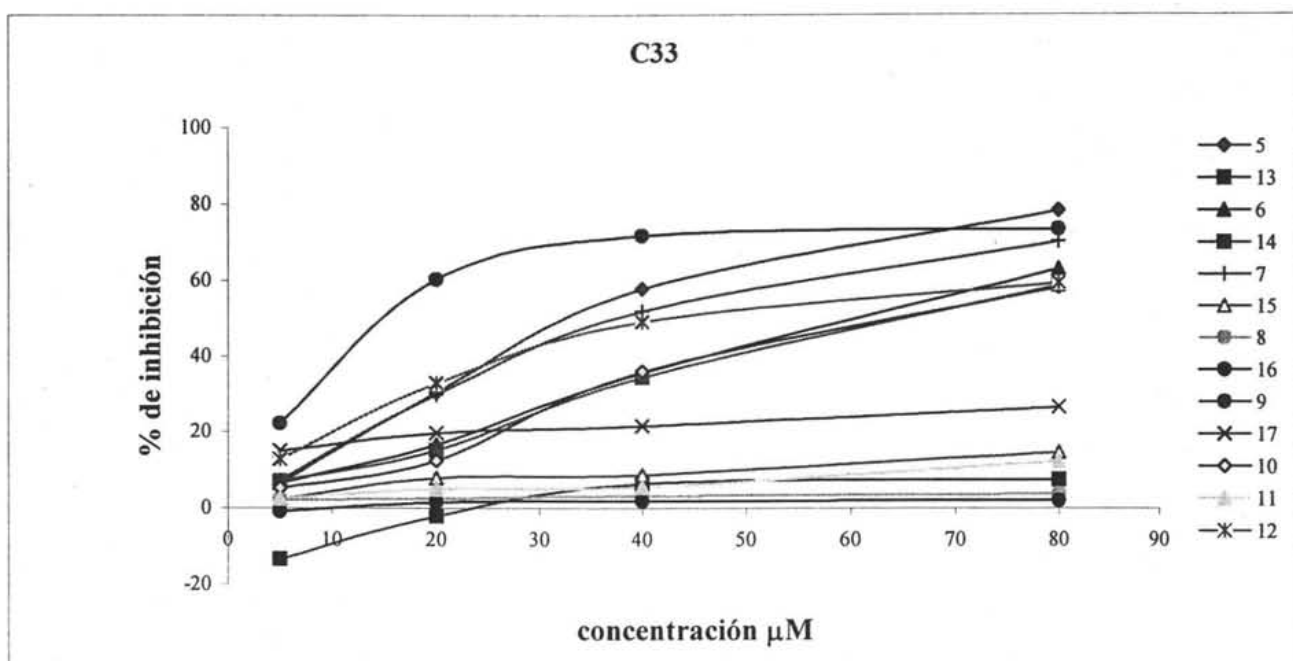
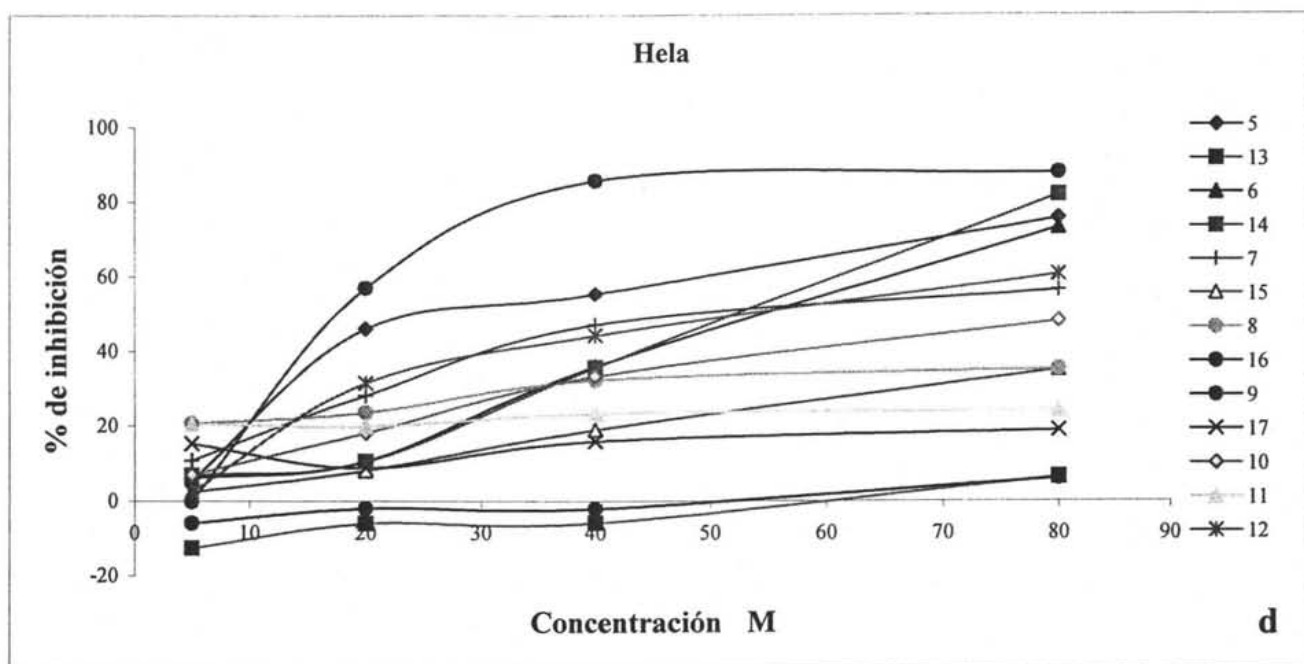


Figura 6. Citotoxicidad de los compuestos 5 a 17 en las líneas celulares (c) HeLa y (d) C33. Los compuestos fueron probados a las concentraciones de 5, 20, 40 y 80 μM durante 72 horas como se indica en la parte experimental. Los resultados son el promedio de tres experimentos independientes, los cuales se hicieron por sextuplicado.

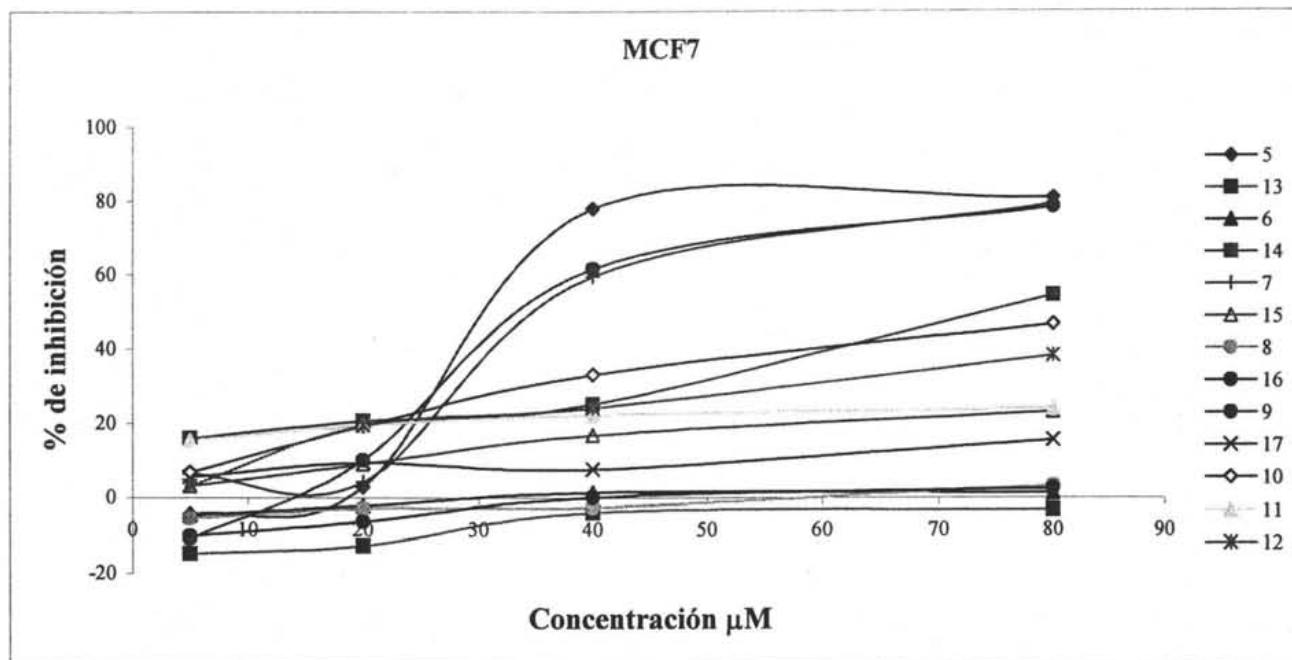


Figura 7. Citotoxicidad de los compuestos 5 a 17 en la línea celular (e) MCF7. Los compuestos fueron probados a las concentraciones de 5, 20, 40 y 80 μM durante 72 horas como se indica en la parte experimental. Los resultados son el promedio de tres experimentos independientes, los cuales se hicieron por sextuplicado.

TABLA 4.-Valores de IC₅₀ de las 2,6-diarilidenciclohexanonas **5 a 12** en las líneas celulares tumorales

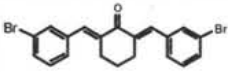
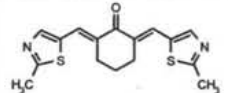
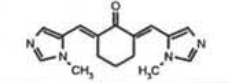
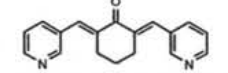
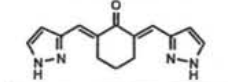
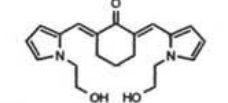
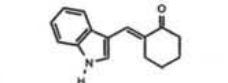
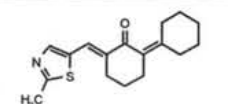
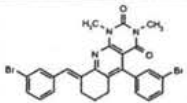
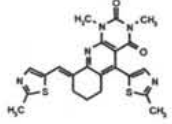
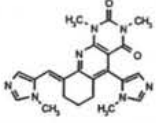
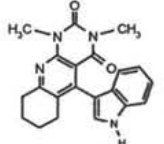
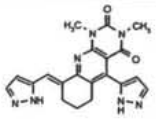
No	Molécula	IC ₅₀ μM				
		HeLa	K562	MCF7	C33	SW480
5		28.8	59.6	45.7	30.8	26.7
6		56	52.2	>80	63.2	>80
7		24	23.4	48	37.6	62.3
8		>80	>80	>80	>80	>80
9		19	15.5	47.42	16.6	21.5
10		>80	>80	>80	>80	>80
11		>80	>80	>80	>80	>80
12		50.2	47.96	>80	47.07	53.06

TABLA 5. Valores de IC₅₀ de las 2,6-diarilidenciclohexanonas **13 a 17** en las líneas celulares tumorales

No	Molécula	IC ₅₀ μM				
		HeLa	K562	MCF7	C33	SW480
13		>80	>80	>80	>80	>80
14		52.0	45.5	76.0	66.0	62.9
15		>80	>80	>80	>80	>80
16		>80	>80	>80	>80	>80
17		>80	>80	>80	>80	>80

Análisis del ciclo celular.

Con el fin de evaluar la actividad del compuesto mas activo (compuesto **9**) en las diferentes fases del ciclo celular de la línea HeLa se procedió a realizar un análisis por citometría de flujo. El análisis fue hecho en función de la concentración y el tiempo de exposición al compuesto **9**. Se decidió utilizar la concentración de 9.5 y 19 μM que corresponden a 0.5 y 1.0 de la IC₅₀ y los tiempos de 24, 48 y 72 horas de exposición al compuesto.

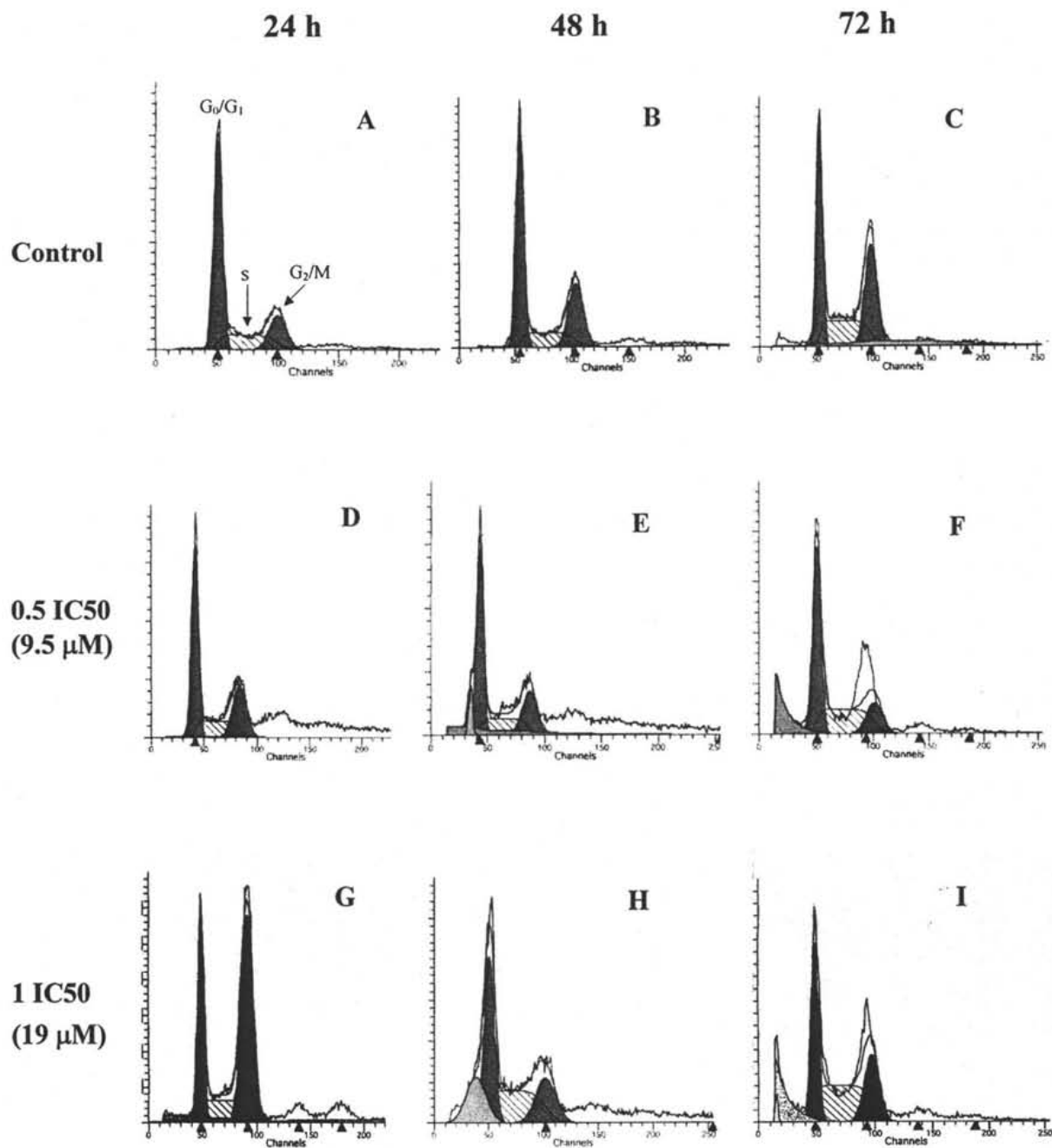
La figura 8-A muestra que después de que las células fueron tratadas con el compuesto **9** a una concentración de 9.5 μM (0.5 de IC50) durante 24 horas no se observó un cambio significativo en la distribución de la población celular con respecto al control de células sin tratar. La figura 8-A muestra que después de tratar a las células con este compuesto a una concentración de 19 μM (1.0 de IC50) existe una disminución significativa (16.33%) con respecto al control de las células que se encuentran en fase G0/G1. Igualmente se observa un aumento significativo de la población celular en fase G2/M de un 13.45% para las células tratadas con el compuesto activo respecto al control, mientras que la fase S permanece sin cambios. Es interesante hacer notar que a esta concentración y tiempo aparece una población que se encuentra en fase subG0/G1 (12.79%) indicativa por lo general de degradación de ADN de muerte celular.

Después de tratar a las células HeLa con el compuesto **9** a una concentración de 9.5 μM (0.5 IC50) durante 48 horas existe una disminución significativa 8.92% en la población celular en la fase G0/G1, mientras que la fase G2/M permanece sin cambios significativos respecto al control; cabe destacar que a esta concentración del compuesto y a este tiempo de exposición aparece una población en fase subG0/G1 (7.17%) indicativa de posible muerte celular (Figura 8-B). Cuando las células fueron tratadas con el compuesto **9** a una concentración de 19 μM (1 IC50) durante 48 horas (figura 8-B) se observa una disminución significativa (9.22%) de las células en fase G0/G1 con respecto al control similar al tratamiento con 0.5 veces la IC50, así mismo se observa un aumento (11.91%) de las células en fase S con respecto al control y una disminución de la población celular en fase G2/M de un 24.22% para el control a un 17.92% después del tratamiento; es importante destacar que a este tiempo de exposición y concentración del compuesto se puede observar un aumento drástico en la población que se encuentra ya en fase subG0/G1 (22.66%).

La figura 8-C muestra que después de 72h de tratamiento con 9.5 μM del compuesto **9** la población celular en fase G0/G1 permanece sin variación significativa mientras que existe un aumento significativo (6.12%), con respecto al control de las células que se encuentran en fase S. Además, después del tratamiento se observa una disminución en el

porcentaje de células en la fase G2/M (8.11%) en relación al control y un aumento significativo en las células en la fase sub G0/G1 (19.01 %).

Después de tratar a las células durante 72h con el compuesto **9** a una concentración de 19 μ M se observa un aumento en la población de células en la fase G0/G1 de 7.42 %, con respecto al control, de la misma forma se observa una disminución significativa de un 10.77 % de la población en fase S con respecto al control. La población en fase G2-M aumento un 9.22 % para las células tratadas con el compuesto en relación al control, y la población en fase sub G0/G1 alcanzó un 21.55 % (figura 8-C) porcentaje similar al alcanzado con la misma concentración del compuesto (19 μ M) a 48 horas de exposición.



Histograma 1 A-C. Histogramas obtenidos de la citometría de flujo de células HeLa analizadas por fluorescencia de yoduro de propidio (contenido de ADN). Las muestras fueron analizadas en un citómetro de flujo (Becton Dickinson. San Jose. CA, USA) y los datos fueron analizados con el programa Cell Quest (Phoenix Flow Systems, San Diego, CA, USA). Los histogramas **A-C** muestran el control disolvente (DMSO) a las 24, 48 y 72h, **D-F** muestran el tratamiento con el compuesto **9** a $9.5 \mu\text{M}$ (0.5 IC_{50}) a 24, 48, y 72 h. **G-I** muestran tratamiento con el compuesto **9** a $19 \mu\text{M}$ (1 IC_{50}) a 24, 48 y 72 h respectivamente.

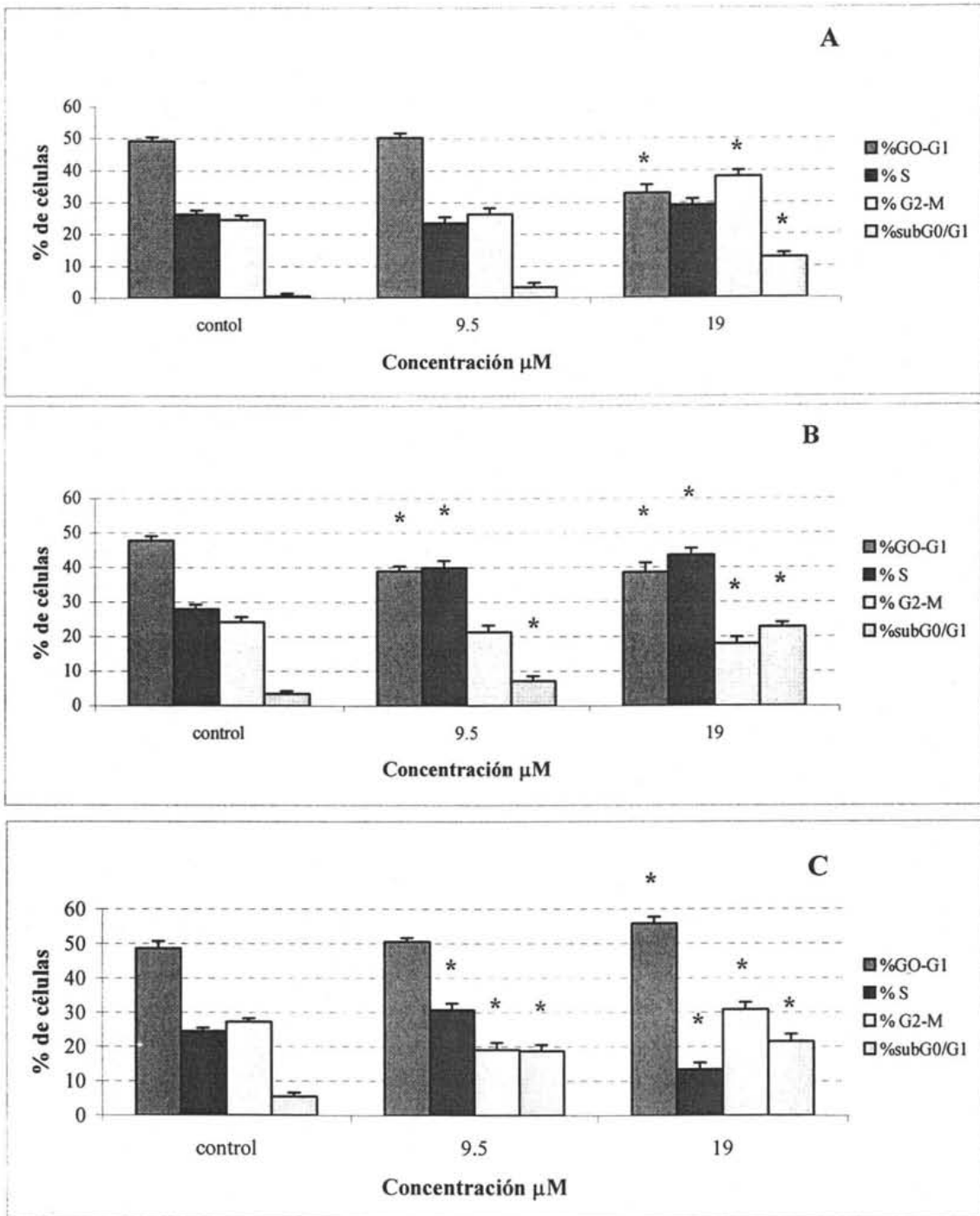


Figura 8. Citometría de flujo de células HeLa tratadas con el compuesto **9** a las concentraciones de 9.5 μM (0.5 IC₅₀) y 19 μM (1 IC₅₀) (A) después de 24 horas (B) después de 48 horas y (C) después de 72 horas. Los resultados son el promedio de dos experimentos. * Diferencia significativa respecto al control $P < 0.05$.

4 Análisis de resultados

4.1 Parte química

En general, la reacción de condensación aldólica utilizada entre 2 equivalentes de aldehído y un equivalente de ciclohexanona con catálisis básica produjo resultados con rendimientos superiores al 75%, obteniéndose compuestos simétricos con la ciclohexanona sustituida en los carbonos 2 y 6 (α al carbonilo).

Para el caso del compuesto **11** sólo se obtuvo el producto de la condensación del aldehído con el carbono 2 de la ciclohexanona sin lograrse la doble condensación, lo que puede ser atribuible a efectos estéricos de la molécula de indol. Por otro lado, el compuesto **12**, también fue obtenido en buen rendimiento aprovechando que la ciclohexanona es susceptible de autocondensarse.

Para el compuesto **5** se observa en el espectro de masas un ión molecular correspondiente al peso esperado (m/z 432) además de los picos $M^+ + 1$ y $M^+ + 2$ y una pérdida de $M^+ - 81$ (pico base), característicos de la presencia de bromo. En IR se observan bandas de absorción para carbonilo α, β insaturado en 1661 cm^{-1} y señales de C-H aromáticos ($3055, 3016\text{ cm}^{-1}$), con sobretonos en 783 para sustitución meta. En el espectro de RMN ^1H aparece la señal característica para el protón vinílico en 7.70 ppm, así como las señales para los protones del anillo de ciclohexanona en 1.81 y 2.90 ppm, además del sistema ABX aromático.

Para el compuesto **6** en el espectro de masas se observa un ión molecular (m/z 316) correspondiente al peso esperado y un pico base en $M^+ - 41$, correspondiente a la pérdida de $\text{CH}_3\text{C}=\text{N}$. En IR, se observan bandas para el carbonilo α, β insaturado en $1657, 1593\text{ cm}^{-1}$ y señales para C-H aromáticos (3079 cm^{-1}). En su espectro de RMN ^1H aparece la señal característica de la formación del protón vinílico en 7.89 ppm, las señales para los protones de la base de ciclohexanona en 1.95 y 2.84 ppm así como el protón de los anillos aromáticos en 7.87 ppm y el metilo en 2.77 ppm.

El compuesto **7** en su espectro de masas muestra un ión molecular (m/z 282) correspondiente al peso esperado que además es el pico base y una pérdida de $M^+ - 95$ correspondiente al fragmento N-metilimidazolilo. En IR, se observan señales para C-H aromáticos ($2976, 1264\text{ cm}^{-1}$), para el carbonilo α, β insaturado ($1608, 1573\text{ cm}^{-1}$) y para C-N (1418 cm^{-1}). En su espectro de RMN ^1H se observa el protón vinílico característico en 7.55 ppm , los protones para la base de ciclohexanona en 1.87 y 3.36 ppm , los protones aromáticos en 7.27 y 6.98 ppm , así como el N-metilo en 3.79 ppm .

El compuesto **8** en su espectro de masas muestra un ión molecular (m/z 276) correspondiente al peso esperado que además es el pico base y una pérdida de $M^+ - 90$ correspondiente al fragmento de piridilo. En IR, se observan señales para C-H aromáticos (3081 cm^{-1}), para el carbonilo α, β insaturado (1632 cm^{-1}) y para CH-N (3398 cm^{-1}). En su espectro de RMN ^1H se observa el protón vinílico característico en 7.66 ppm , los protones para la base de ciclohexanona en 1.81 y 2.47 ppm , además de los protones aromáticos entre 8.39 y 8.56 ppm .

Para el compuesto **9** en su espectro de masas se observa un ión molecular correspondiente al peso esperado (m/z 254) que además es el pico base, así como una pérdida de $M^+ - 26$ correspondiente a C-N (Apéndice 2-a). En el espectro de IR se observan señales para C-H aromáticos (3047 cm^{-1}), y señales para carbonilo α, β insaturado (1663 cm^{-1}) (Apéndice 2-b). En su espectro de RMN ^1H se observa el protón vinílico en 7.63 ppm , los protones aromáticos en 7.52 y 6.44 ppm , además de las señales para los protones de la base de ciclohexanona en 1.63 y 2.72 ppm (Apéndice 3).

El compuesto **10** en su espectro de masas muestra un ión molecular correspondiente al peso esperado (m/z 340) que además es el pico base. En su espectro de IR se observan señales para C-H aromáticos (2942 cm^{-1}), para OH (3438 cm^{-1}) y para el carbonilo α, β insaturado (1588 cm^{-1}). En su espectro de RMN ^1H se observa el protón vinílico característico en 7.66 ppm , los protones para la base de ciclohexanona en 1.77 y 2.75 ppm , los protones aromáticos en $6.21, 6.52$ y 6.66 ppm , así como los protones metilénicos unidos

a nitrógeno (N-CH₂) en 3.61 ppm y los protones metilénicos del alcohol (CH₂OH) en 4.09 ppm.

Para el compuesto **11** en su espectro de masas se observa un ión molecular correspondiente al peso esperado (m/z 255) que además es el pico base. En el espectro de IR se observan señales para C-H aromáticos en 3143 cm⁻¹ con sobretonos en 1136 y 741 cm⁻¹ además de las señales en 1642 cm⁻¹ para el carbonilo α , β insaturado. En su espectro de RMN ¹H se observa la señal característica para el protón vinílico en 8.0 ppm así como los protones para la base de ciclohexanona con señales en 1.84-1.95, 2.52, y 2.78 ppm, así como los protones aromáticos con señales entre 7.86-7.19 ppm.

Para el caso de los compuestos tricíclicos **13** a **17** la reacción de transferencia de fases propuesta por Díaz *et al* (2000, 2002, 2003), fue lograda con rendimientos aceptables.

De acuerdo a los datos espectroscópicos obtenidos y al mecanismo de reacción (Apéndice 1) propuesto por Díaz *et al* (2000), es posible asignar las estructuras propuestas de los compuestos **13** a **17**.

Para el compuesto **13** en EM se observa un ión molecular (m/z 566) correspondiente al peso además del pico base en M⁺+2 (m/z 566). En su espectro de IR se observan señales en 3062cm⁻¹ con sobretonos en 787 cm⁻¹ pertenecientes a C-H aromáticos, además de señales en 1708 cm⁻¹ correspondientes a carbonilo, así como señales en 1407 cm⁻¹ correspondientes a C-N. En su espectro de RMN ¹H se observa la señal característica para el protón vinílico en 7.59 ppm, además de las señales de los protones para la base de ciclohexano en 3.34 y 3.82 ppm, así como el sistema ABX para los protones aromáticos.

Para el compuesto **14** en su espectro de masas se obtuvo un ión molecular correspondiente al peso esperado (m/z 451) que además fue el pico base y una pérdida de M⁺-41 correspondiente a CH₃C=N. En su espectro de IR se observan las señales características en 3076 cm⁻¹ para C-H aromáticos en 1709 y 1666 cm⁻¹ para carbonilo y en 1455 cm⁻¹ para C-N. Para el espectro de RMN ¹H se obtuvieron las señales para los protones de la base de ciclohexano (1.85, 2.56, 2.85 ppm), aquellas para el protón vinílico

(7.85 ppm), para los protones de metilo unidos a nitrógeno (3.83 y 3.38 ppm) y para los metilos del anillo aromático (2.81, 2.77 ppm) así como los protones del tiazol (8.25 y 7.32 ppm).

Para el compuesto **15** en su espectro de masas se obtuvo un ión molecular correspondiente al peso esperado (m/z 417) que además fue el pico base y una pérdida de $M^+ - 15$ correspondiente a CH_3 . En su espectro de IR se observaron señales en 3137 cm^{-1} para C-H aromáticos, en 1705 , 1659 cm^{-1} para carbonilo y en 1475 cm^{-1} para C-N. Para el espectro de RMN 1H se observaron las señales para los protones de la base de ciclohexano (1.89, 2.27, 2.76 ppm), aquellas para el protón vinílico (7.94 ppm), para los protones de metilo (3.37 y 3.44, 3.81, 3.85 ppm) y para los protones aromáticos (7.03, 7.13 y 7.32 ppm).

Para el compuesto **16** en su espectro de masas se obtuvo un ión molecular correspondiente al peso esperado (m/z 360) que además fue el pico base. En su espectro de IR se obtuvieron las señales características en 3057 cm^{-1} para C-H aromáticos, en 1700 , 1650 cm^{-1} para carbonilo y en 1455 cm^{-1} para C-N. Para su espectro de RMN 1H se obtuvieron las señales para los protones de la base de ciclohexano (1.59-1.70, 1.82-1.91, 2.40, 3.00 ppm), para los protones de metilo unidos a nitrógeno (3.17 y 3.24 ppm), así como los protones aromáticos (6.98, 7.04, 7.06, 7.14, 7.46 ppm).

Para el compuesto **17** en EM se obtuvo un ión molecular correspondiente al peso esperado (m/z 389), y el pico base en $M^+ - 344$ (Apéndice 4-a). En IR se obtuvieron las señales características en 3049 cm^{-1} para C-H aromáticos en 1707 , 1652 cm^{-1} para carbonilo y en 1438 cm^{-1} para C-N (Apéndice 4-b). En RMN 1H se obtuvieron las señales para los protones de la base de ciclohexano (1.86, 2.53, 2.95 ppm), aquellas para el protón vinílico (8.22 ppm), para los protones de metilo unidos a nitrógeno (3.84 y 3.35 ppm) así como los protones aromáticos (6.42, 6.70, 7.87, 7.93 ppm) (Apéndice 5).

4.2 Parte biológica

Los resultados muestran que los compuestos con mayor actividad citotóxica son las 2,6-diarilidenciclohexanonas, los cuales poseen en su estructura una parte carbonílica α β insaturada y se observa que esta parte es necesaria, ya que cuando es transformado por la adición de una molécula de 6-amino-1,3-dimetiluracilo la actividad citotóxica se elimina.

Así como también se ha demostrado que cuando se reduce el doble enlace en compuestos con estructura similar como las chalconas, la actividad citotóxica es totalmente inhibida (Ducki *et al.*, 1997), el hecho se confirma ya que cuando las cetonas α β insaturadas son transformadas al epóxido correspondiente, la citotoxicidad disminuye dramáticamente (Xia, 2000).

Se ha reportado que un gran número de cetonas α , β insaturadas presentan reactividad preferencial hacia los tioles (Lee *et al.*, 1997). La alquilación de glutation con chalconas ha demostrado que formán aductos en la posición β . Con base a lo anterior podríamos proponer que el método de acción de estos compuestos podría involucrar un proceso de alquilación, posiblemente vía adición de Michael. Este tipo de adiciones ha sido propuesta también por otros autores (Ducki *et al.*, 1997; Xia, 2000 y Lawrence, 2000). Por otro lado sabemos que las 2,6 diarilidenciclohexanonas sintetizadas forman aductos con el 6-amino-1,3-dimetiluracilo vía adición de Michael, una reacción similar pudiera estar ocurriendo también *in vivo*.

En el caso de las lactonas sesquiterpénicas cuyas estructuras contienen compuestos carbonílicos α β insaturados, se lleva a cabo la adición vía Michael con los grupos pirimidínicos celulares y esto es el origen de su citotoxicidad (Quintero *et al.*, 1999).

El compuesto **5** (Tabla 5) que posee un grupo desactivante en la posición meta, resultó uno de los más activos. Otras chalconas reportadas en la literatura con la presencia de grupos electroatrayentes en el anillo aromático aumentan su citotoxicidad (Ducki *et al.* 1997 y 1998; Xia, 2000 y Lawrence, 2000). El compuesto **8** análogo del compuesto **5**, es

menos activo, contiene en su estructura un anillo de piridina el cual tiene un carácter electrónico muy parecido al benceno, por lo que podemos resumir que el doble enlace en estos compuestos, así como sustituyentes desactivantes como el bromo son necesarios para su actividad citotóxica.

En este orden de ideas Bois y col (1998) demostraron que la sustitución de diferentes halógenos en los anillos aromáticos de algunas chalconas gradualmente aumentan la afinidad de unión a proteínas como la glicoproteína-P, con una fuerte dependencia de la naturaleza del halógeno: $I > Br > Cl > F > H$ y que el efecto parece correlacionar con la constante de lipofilicidad π del sustituyente y el tamaño del halógeno ya que siguen la misma tendencia. Sin embargo la actividad elevada del compuesto **5** podría ser atribuida únicamente a la citotoxicidad inherente del bromo, esto puede ser descartado ya que se observa que en el compuesto **13** que posee un sustituyente bromo pero no el sistema carbonílico α , β insaturado, este compuesto perdió drásticamente la actividad biológica.

Cuando el mecanismo de acción se lleva a cabo vía una adición del Michael, se ha observado que grupos desactivantes en el anillo aromático de compuestos como las chalconas aceleran esta reacción (Lawrence, 2000).

Comparando los compuestos heterocíclicos se puede observar que los compuestos de cinco miembros son más activos que el compuesto **8** que posee 6 miembros.

Dentro de los compuestos con cinco miembros, los más activos son aquellos con dos heteroátomos. Dentro de estos compuestos, el más activo fue el **9** que comparado con los demás, podemos decir que es el que contiene un sustituyente aromático de menor tamaño a diferencia de los otros compuestos que tienen sustituyentes de mayor tamaño. En el caso del compuesto **11** en el que el sustituyente aromático es un anillo indol, se evidencia esta propuesta por su nula citotoxicidad a las concentraciones probadas. Y el hecho de que esto se deba a efectos estéricos se ve reforzado por dos razones: 1) porque al intentar introducir otro sustituyente aromático a la molécula del compuesto **11** la reacción

no procedió aún cuando las condiciones fueron mas drásticas. 2) de las 2,6-diarilidenciclohexanonas que llevaron a cabo la reacción de adición de 6-amino-1,3-dimetiluracilo esta fue la que se obtuvo con menor rendimiento.

Otro de los factores que pudieron influir en los resultados fueron los electrónicos, ya que si se propone que el compuesto esta actuando mediante una adición de Michael, es necesario mantener la carga parcial en el carbono β al carbonilo de la ciclohexanona y de esta manera compuestos como el **7** y **10** que tienen sustituyentes en el anillo aromático como el metilo, que pueden tener un efecto ligeramente activante hacia el anillo y facilitar que este, de alguna manera tienda a compensar la carga parcial del carbono β al carbonilo y así hacerlo menos reactivo.

Análisis del ciclo celular.

El análisis de las fases del ciclo celular de las células HeLa tratadas con el compuesto **9** demuestra que se produce una alteración durante la progresión del ciclo. Estos resultados son congruentes con lo reportado en la literatura, donde compuestos como la 3'-metil-3-hidroxichalcona afecta la progresión del ciclo celular en múltiples fases, ya que este compuesto detiene a las células en fase G0/G1, y retrasa las células a la S (Satomi, 1993). Lo anterior también ha sido demostrado en el caso de algunos flavonoides (Matsukawa *et al.*, 1993). Los resultados obtenidos en el presente trabajo muestran que las células tratadas con el compuesto **9** a 24h a una concentración de 19 μ M (Figura 8-A) producen un aumento significativo en la fase G2/M. En el caso de compuestos como las chalconas se ha demostrado a dosis mayores de 10 μ M se observa un incremento de células en la fase G2/M y un incremento paralelo en la fase S (De Vincenzo, 2000)

Debido a que el ADN y otras macromoléculas pueden ser dañadas en diferentes puntos del ciclo celular, existen múltiples puntos de control para garantizar la sobrevivencia de la célula mediante la regulación de la progresión de las fases del ciclo. La literatura menciona que si el daño se produce mientras el ADN se está replicando, las proteínas CHK1 y CHK2 son fosforiladas por ATM y pueden inhibir a las fosfatasa requeridas para la progresión G1/S y G2/M (Sherr y Roberts, 1999). De igual forma se sabe que después de

producirse daño al ADN, p53 activa transcripcionalmente a p21 y se origina un arresto en G0/G1 (Stewart y Pietenpol, 2001).

El daño al ADN y la hipoxia pueden originar modificaciones postraduccionales que activan a la proteína p53, la cual regula a la alta la expresión de genes como *p21* y *bax*, los cuales median señales que dirigen a la inhibición del crecimiento celular, la inducción de apoptosis o la reparación del ADN.

En general se puede proponer que el compuesto **9** puede ejercer su efecto al interactuar con algunas macromoléculas como las proteínas o el ADN, pues se ha observado que compuestos con similar estructura como la 3'-metil-3-hidroxichalcona modulan la síntesis de proteínas en líneas celulares tumorales, en especial las proteínas de "choque térmico" las cuales posiblemente controlan la progresión del ciclo celular; por otra parte estos compuestos también modulan el estado de fosforilación de otras clases de proteínas presentes tanto en el citosol como en el núcleo, reduciendo la fosforilación de las primeras y aumentando la de las segundas, lo que es importante ya que la fosforilación de proteínas es muy importante en las señales de transducción y factores de crecimiento son regulados por esta vía (Satomi, 1993).

El hecho más importante a destacar en los resultados del análisis del ciclo celular es la aparición de una población celular en fase subG0/G1 indicativa de muerte celular, con lo que los podemos sugerir que el compuesto no es citostático sino que provoca la muerte en las células tumorales. La presencia de células en la fase subG1 sugiere muerte por apoptosis aunado a la morfología observada en las células después de ser tratadas con el compuesto las cuales presentan encogimiento celular y condensación de cromatina (datos no mostrados). La literatura muestra que compuestos con estructura análoga como los flavonoides pueden inducir apoptosis en células de carcinoma mediante la activación de caspasa 3 y miembros proapoptóticos de la familia Bcl-2 (Iwashita, *et al*, 2000; Chen, *et al*, 2002)

5. CONCLUSIONES

- Los compuestos **5** a **12** fueron obtenidos en rendimientos aceptables mediante la reacción de condensación aldólica entre los aldehídos y la ciclohexanona.
- Para el caso del compuesto **11** solo se obtuvo la ciclohexanona monosustituida debido a efectos estéricos.
- Los derivados tricíclicos **13-17** fueron obtenidos en rendimientos aceptables mediante la reacción en transferencia de fases catalizada con el Tritón B.
- No pudieron obtenerse los derivados de uracilo de los compuestos **10** y **12** debido a efectos estéricos.
- La actividad citotóxica de los compuestos **5** a **12** fue dosis-dependiente.
- Los derivados tricíclicos **13** a **17**, no presentaron actividad citotóxica a las concentraciones probadas en los experimentos, a excepción de **14** que presenta actividad a concentraciones mayores a 45 μM .
- En la estructura de los compuestos **5** a **12** es necesaria la presencia del grupo carbonílico α β insaturado y cuando este grupo es eliminado por la adición de 6-amino-1,3-dimetiluracilo la actividad citotóxica se pierde casi completamente.
- Los compuestos con sustituyentes aromáticos heteroatómicos de cinco miembros (**6**, **7**, **9**, **10**, **11**, **12**) son más activos que el que contiene seis miembros (**8**).
- El compuesto **9** produjo alteraciones en el ciclo celular de la línea tumoral HeLa y el efecto fue dependiente de la concentración y del tiempo de exposición.
- Se produjo una población celular en fase SubG0/G1 (indicativa de muerte) a un máximo a las 48 horas de tratamiento con **9** a una concentración de 19 μM .

6. Parte experimental

6.1 Parte química

Información general

Las materias primas utilizadas en este trabajo fueron grado reactivo y se obtuvieron a través de la empresa Aldrich. Los disolventes utilizados en la purificación de los productos fueron de grado técnico y se purificaron según las metodologías ya establecidas en la literatura.

El Tetrahidrofurano THF utilizado en las reacciones anhidras se destiló de sodio metálico y benzofenona bajo atmósfera inerte de argón. El THF se calentó a reflujo hasta adquirir una coloración azul intenso a morado, característica propia del radical cetilo indicándonos con esto que el THF se encontraba libre de humedad.

Los puntos de fusión fueron determinados en un aparato Büchi 510 y no están corregidos. Los espectros de IR fueron determinados en la región entre 4000 a 400 cm^{-1} en un espectrofotómetro Perkin-Elmer 282-B y Nicolet FT-IR magna 55X, utilizando la técnica de pastilla y disolución, empleando CHCl_3 como disolvente. Los espectros de masas se generaron por la técnica de impacto electrónico en un aparato JEOL JMS-5X 10217, mediante introducción directa a 70 eV. Los espectros de RMN^1H fueron obtenidos utilizando un equipo Varian Unity 300 y 200. los desplazamientos químicos (δ) se reportan en partes por millón (ppm) con respecto a la referencia de tetrametilsilano (TMS) para ^1H ; las constantes de acoplamiento (J) están dadas en Hertz (Hz). La multiplicidad de las señales se denotó con las siguientes abreviaciones: s para indicar un singulete, d para indicar un doblete, t para un triplete, c para una señal cuádruple, q para un quinteto y m para una señal múltiple, empleando en ocasiones combinaciones de ellas.

Todas las reacciones fueron monitoreadas por cromatografía en capa fina, utilizando placas de aluminio recubiertas de gel de sílice de 0.25 mm de espesor (sílica gel 60 GF₂₅₄ Merck). La purificación de los productos obtenidos de las reacciones se llevó a cabo en cromatografía en columna utilizando sílica gel Merck 60 (230-400 mm).

Métodos de síntesis.

N-Metilimidazol (2)

En un matraz de fondo redondo de 50 mL se mezclaron 6.8 g (0.1 mol) de imidazol y 30 mL de una solución al 50 % de hidróxido de sodio. En seguida se adicionaron 17.03 g (0.12 mol) de yoduro de metilo. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante una hora (Esquema 2), después de este tiempo se formaron dos fases, la fase orgánica correspondiente al N-metilimidazol se separó y secó con sulfato de sodio anhidro. Aceite 50% de rendimiento.

1-Metil-5-formilimidazol (3)

A una solución de 1.64 g (0.02 mol) de 1-metilimidazol en 50 mL de THF anhidro, enfriada a $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ se le adicionaron gota a gota y bajo atmósfera de argón 0.02 mol de *n*-butillitio (13.33 mL de una solución 1.5 molar) cuidando que la temperatura no subiera a más de $-35\text{ }^{\circ}\text{C}$. Después de la adición se continuó la agitación durante 20 minutos a $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ y en seguida se adicionaron 2.19 g (0.03 mol) de dimetilformamida anhidra. La reacción se dejó agitando durante 18 horas. La mezcla se vertió a una solución acuosa fría de HCl al 20% y se extrajo el producto con acetato de etilo (4X50); las fases orgánicas se juntaron, se secaron con sulfato de sodio anhidro y se evaporaron a vacío (Esquema 3). El residuo obtenido se recrystalizó de cloruro de metileno y metanol, obteniéndose 1.76 g de 1-Metil-5-formil-imidazol. (80% de rendimiento).

2-Metil-5-formiltiazol (4)

A una solución de 645 mg de 2-metil-5-(hidroximetil)tiazol (5 mmol) en 30 mL de cloruro de metileno, se le adicionaron 645 mg de clorocromato de piridonio y dos gotas de ácido acético. La reacción se agitó a temperatura ambiente. La adición de clorocromato de piridonio se repitió cada tres horas hasta que la reacción terminó (C.C.F. Hexano-AcOEt 60:40) (Esquema 4). La mezcla de reacción se pasó por una columna de 30 g de sílica gel (230-400 mallas), eluyendo con hexano-AcOEt (60:40). Se obtuvo un sólido blanco, que se recrystalizó de cloruro de metileno, p.f. $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ 86% de rendimiento.

(2E)-2-(1H-Indol-3-iliden)ciclohexanona (11)

A una solución de 200 mg de hidróxido de sodio (5mmol) en 2 mL de agua, se adicionó con agitación una solución de 196 mg de ciclohexanona (2 mmol) y 145 mg (1 mmol) de 3-indolaldehído disuelto en 3 mL de etanol. La mezcla se dejó agitando durante 18 horas, al cabo de las cuales se formó un sólido anaranjado (Esquema 5). El sólido se filtró y se recristalizó de cloruro de metileno-hexano, obteniéndose 210 mg de producto (94% de rendimiento) p.f. 248-250 °C. Los datos espectroscópicos se muestran en la tabla 5.

(3E)-2-(5-Metil-tiazol-2-iliden)-6-(ciclohexen)ciclohexanona (12)

A una solución de 200 mg de hidroxido de sodio (5 mmol) en 2 mL de agua se adicionó con agitación una solución de 196 mg de ciclohexanona (2 mmol) y 127 mg del 2-metil-4-tiazolaldehído (1 mmol) en 2 mL de etanol. La mezcla se dejó agitando durante 18 horas, al cabo de las cuales se formó un sólido amarillo (Esquema 6). El sólido se filtró y se cristalizó de cloruro de metileno-hexano obteniendo 230 mg de producto con p.f. 164-166 °C. Los datos espectroscópicos se muestran en la tabla 5.

Preparación de las 2,6-diarilidenciclohexanonas (5-10)

Todos los compuestos se prepararon usando el siguiente procedimiento (Esquema 7):

A una solución de 3 mmol de ciclohexanona y 6 mmol del aldehído correspondiente en 5 mL de etanol se le agregó con agitación 600 mg de hidróxido de sodio (25 mmol) disueltos en 6 mL de agua. La reacción se dejó en agitación durante 24 horas. El sólido que precipitó, se filtró y lavo con una mezcla fría de hexano-eter (1:1)*. La diarilidenciclohexanona resultante se cristalizó del disolvente indicado en la tabla 2. Los datos espectroscópicos se muestran en la tabla 5.

* Cuando no se formó el precipitado, la mezcla de reacción se vertió en agua y el producto se extrajo con cloruro de metileno (3X30 mL). Las fases orgánicas se juntaron, se secaron con sulfato de sodio anhidro y se evaporaron.

Método general para la preparación de los derivados tricíclicos 13–17 (Esquema 8)

A una suspensión de 2 mmol de 6-amino-1,3-dimetiluracilo (310 mg) en 3 mL de cloruro de metileno, se adicionaron 1 mL de Tritón B (sol. Al 40% en metanol) y 1 mL de agua. Enseguida se adicionó con agitación magnética 1 mmol de la 2,6-diarilidenciclohexanona correspondiente disuelta en 5 mL de cloruro de metileno. La mezcla se agitó a temperatura ambiente hasta que la 2,6-diarilidenciclohexanona se consumió (C.C.F.). la reacción se diluyó con 5 mL de cloruro de metileno y 5 mL de agua; el producto se extrajo con cloruro de metileno (2X5 mL). Los extractos orgánicos se juntaron, se lavaron con agua (1X5 mL), se secaron sobre sulfato de sodio anhidro y se evaporaron. El residuo se purificó por cromatografía en columna de silica gel (230-400 mallas). Los datos espectroscópicos se muestran en la tabla 6.

Tabla 6. Datos espectroscópicos y espectrométricos de los compuestos 5-17.

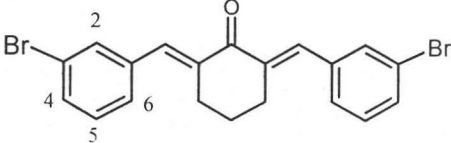
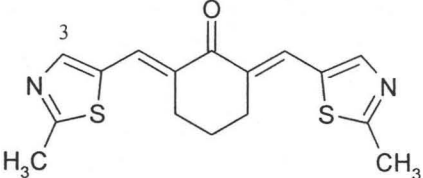
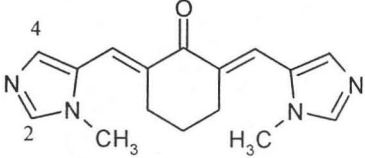
Compuesto	Datos espectroscópicos y espectrométricos seleccionados
 <p>(2E, 6E)-2,6-Bis (3-bromobenciliden) ciclohexanona (5)</p>	<p>EM (IE) m/z: 432 M⁺ (75%), M⁺-81 (100%) IR en KBr (cm⁻¹):3055, 3016, 783 (C-H aromático), 1661 (C=O α,β insaturada), 2941 (CH₂ saturado) Espectro RMN ¹H (CDCl₃) 200 Hz: δ 1.81 (q, 2H, J=6.0 Hz CH₂ CH₂ CH₂), 2.90 (td, J=5.8, 2.2 Hz, 4H, CH₂ CH₂ CH₂), 7.38 (dt, J=7.6, 1.6 Hz, 2H, CH-4), 7.48 (dt, J=7.6, 1.6 Hz, 2H C-H 6), 7.59 (t, J=18 Hz, 2H C-H 2), 7.705 (s, 2H, C=CH), 7.28 (t, J=76 Hz, 2H, C-H 5)</p>
 <p>(2E,6E)-2,6-Bis -(5-metil-tiazol-2-iliden)ciclohexanona (6)</p>	<p>EM (IE) m/z: 316 M⁺ (40%), M⁺-41 (100%) IR en KBr (cm⁻¹):3079 (CHAr), 1657 1 593 (C=O α,β insaturada), 2929 (saturado) Espectro RMN ¹H (CDCl₃) 200 Hz: δ 1.95 (q, J=6.0 Hz, 2H, CH CH₂ CH₂), 2.84 (td, J=6.0, 1.95 Hz, 4H, CH₂ CH₂ CH₂), 7.87 (s, 2H, CH-3), 7.89 (s, 2H, C=CH), 2.77 (s ancho, 6H, CH₃)</p>
 <p>(2E, 6E)-2-(1-metil-imidazol-5-iliden)ciclohexanona (7)</p>	<p>EM (IE) m/z: 282 M⁺ (100 %) M⁺-95 (75 %) IR en sol/CHCl₃ (cm⁻¹): 2976, 1264 (CH Ar), 1608, 1573 (C=O α,β insaturada) 1418 (C-N) Espectro RMN ¹H (CDCl₃+DMSO) 300 Hz: δ 1.87 (q, J=6.0 Hz, 2H, CH₂ CH₂ CH₂) 3.36 (td, J=6.0, 1.8 Hz, 4H, CH₂ CH₂ CH₂) 3.79 (s, 6H, N-CH₃) 6.98 (d, J= 0.8 Hz, 2H, CH-4), 7.27 (d, J=0.8 Hz, 2H, CH-2), 7.55 (s, 2H, C=CH)</p>

Tabla 6. (Continuación)

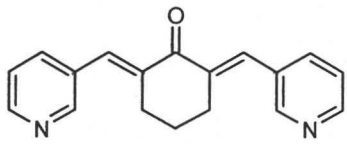
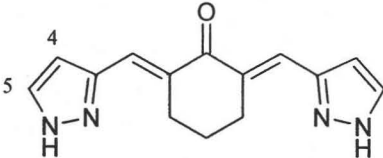
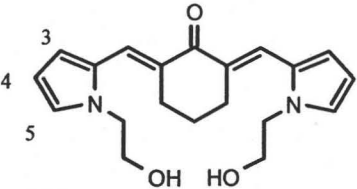
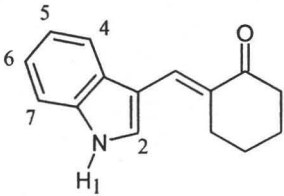
 <p>(2E, 6E)-2,6-Bis(piridin-3-iliden) ciclohexanona (8)</p>	<p>EM (IE) m/z: M^+ 276 (100%), M^+ -90 (50%) IR en KBr (cm^{-1}): 3398 (CHNCH), 3081 (CH Ar), 1632 (C=O α,β insaturada) Espectro RMN ^1H ($\text{CDCl}_3+\text{DMSO}$) 200 Hz: δ 1.81 (q, $J=5.8$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 2.47 (m, 4H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 8.27 (d, $J=2.0$ Hz, 2H, CH-5), 8.39 (td, $J=4.4, 1.8$ Hz, 2H, CH-5), 8.51 (dd, $J=4.6, 1.8$ Hz, 2H, CH-2), 8.56(d, $J=2.0$ Hz, 2H, CH-6)</p>
 <p>(2E, 6E)-2,6-Bis (1H-pirazol-3-iliden) ciclohexanona (9)</p>	<p>EM (IE) m/z: M^+ 254 (100%), M^+-26 (55%) IR en KBr (cm^{-1}):3047, 787 (CH Ar), 1 663, 1609 (C=O α,β insaturada), 2946 (CH₂ saturado) Espectro RMN ^1H ($\text{CDCl}_3+\text{DMSO}$) 300 Hz: δ 1.63 (q, $J=5.7$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 2.72 (td, $J=5.7, 1.8$ Hz, 4H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 6.44 (d, $J=2.1$ Hz, 2H, CH-4) 7.52 (d, $J=2.1$ Hz, 2H, CH-5), 7.63 (s, 2H, C=CH)</p>
 <p>(2E,6E)-2,6-Bis-[1-(2-hidroxi-etil)-pirrol-2-iliden]ciclohexanona (10)</p>	<p>EM (IE) m/z M^+ 340 (100%) IR en KBr (cm^{-1}): 3438 (OH), 2924 (CH-Ar), 1588 (C=O α,β insaturada), 2868 (CH saturado) Espectro RMN ^1H ($\text{CDCl}_3+\text{DMSO}$) 300 Hz: δ 1.77 (q, $J=5.79$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 2.75 (t, $J=5.69$ Hz, 4H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 3.61 (t, $J=5.79$ Hz, 4H, N-CH₂), 4.09 (t, $J=5.76$ Hz, 4H, CH₂OH), 6.21 (t, $J=2.7$ Hz, 2H, CH-4), 6.52 (d, $J=3.03$ Hz, 2H, CH-5), 7.09 (dd, $J=2.35, 1.38$ Hz, 2H, CH-3) 7.66 (s, 2H, C=CH)</p>
 <p>(2E)-2-(1H-Indol-3-iliden) ciclohexanona (11)</p>	<p>EM (IE) m/z: 225 M^+ (100 %) IR en KBr (cm^{-1}): 3143, 1136, 741 (CH Ar), 2921, 2867 (CH₂ saturado) 1642, 1537 (C=O α,β insaturada) Espectro RMN ^1H ($\text{CDCl}_3+\text{DMSO}$) 300 Hz: δ 1.84-1.95 (m, 4H, CO-CH₂CH₂CH₂), 2.52 (t, $J=6.5$ Hz, 2H, CO-CH₂), 2.78 (td, $J=6.54, 1.84$ Hz, CH₂C=CH), 7.19 (td, $J=7.17, 1.86$ Hz, CH-5), 7.24 (td, $J=7.14, 1.86$ Hz, CH-6), 7.86 (d, $J=7.17$ Hz, CH-4), 7.43 (dd, $J=7.17, 1.23$ Hz, CH-7), 7.50 (d, $J=2.82$ Hz, CH-2), 8.0 (t, $J=2.19$ Hz, 1H, C=CH)</p>

Tabla 6. (Continuación)

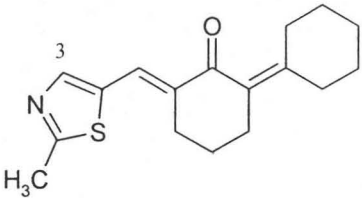
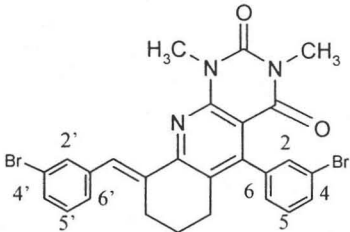
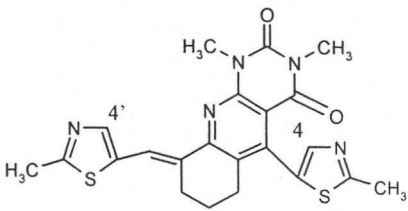
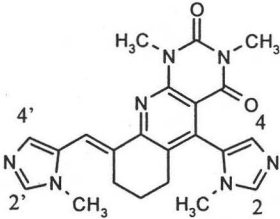
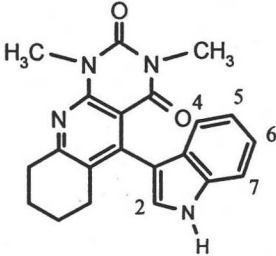
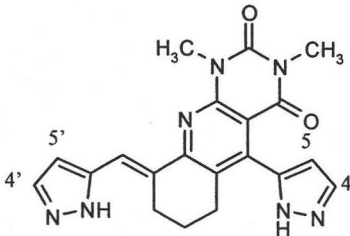
 <p>(3E)-2-(5-Metil-tiazol-2-iliden)-6-(ciclohexen)ciclohexanona (12)</p>	<p>Espectro EM (IE) m/z: M^+ 271 (100%), M^+ - 41 (50%) IR en KBr (cm^{-1}): 3082 (CH-Ar), 1675 (C=O α,β insaturada), 1943 ($\text{CH}_2=\text{CH}_2$) Espectro RMN ^1H ($\text{CDCl}_3+\text{DMSO}$) 300 Hz: δ= 1.208-2.040 (m, 11H, anillo ciclohexano), 2.70-2.79 (m, 4H, $\text{C}=\text{CHCH}_2\text{CH}_2$), 6.96 (s, 1H, $\text{CH}_2-\text{CH}=\text{C}$), 7.48 (s, 1H, CH-3), 7.61 (s, 1H, $\text{C}=\text{CH}$), 2.79 (s, 3H, CH_3)</p>
 <p>(9 E)-9-(3-Bromobenciliden)-5-(3-bromofenil)-1,3-dimetil-6,7,8,9-tetrahidropirimido[4,5-<i>b</i>]quinolin-2,4-(1H, 3H)-diona (13)</p>	<p>Espectro EM (IE) m/z: M^+ 2 (100%), 566 M^+ (60%) IR en KBr (cm^{-1}): 3062, 787 (C-H aromático), 1407 (C-N), 1663, 1708 (C=O), 2944 (CH_2 saturado) Espectro RMN ^1H (CDCl_3) 200 Hz: δ 2.39 (q, $J=5.7$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$) 7.84 (td, $J=6.3, 2.1$ Hz, 4H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$) 3.34 (s, 3H, N-$\text{CH}_3$), 3.825 (s, 3H, N$\text{CH}_3$), 7.05 (dt, $J=7.8, 1.8$ Hz, 1HCH-4'), 7.44 (dt, $J=8.1, 1.5$ Hz, 1H CH-6') 7.28 (t, $J=6.6$ Hz, 1H, CH-5') 7.36 (t, $J=6.6$ Hz, 1H, CH-5) 7.37 (dt, $J=8.1, 1.5$ Hz, 1H, CH-4), 7.56 (dt, $J=7.2, 1.2$ Hz, 1H, CH-6), 7.59 (t ancho, 1H, $\text{C}=\text{CH}$)</p>
 <p>(9 E)-1,3-Dimetil-5-(5-metil-1,3-tiazol-2-il)-9-[(5-metil-1,3-tiazol-2-il)metilen]-6,7,8,9-tetrahidropirimido[4,5-<i>b</i>]quinolin-2,4 (1H, 3H)-diona (14)</p>	<p>Espectro EM (IE) m/z: 451 M^+ (100%), M^+ - 41 (70%) IR en KBr (cm^{-1}): 3076 (CHAr), 1455 (CN) 1709, 166(C=O), 2951 (CH_2 saturado) Espectro RMN ^1H (CDCl_3) 200 Hz: δ 1.85 (q, $J= 5.8$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 2.56 (t, $J=6.0$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 2.77 (s, 3H, CH_3), 2.81 (s, 3H, CH_3), 2.85 (t, $J=6.0$ Hz, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 3.38 (s, 3H, N-$\text{CH}_3$), 3.83 (s, 3H, N$\text{CH}_3$), 7.32 (s, 1H, CH-4'), 7.85 (s, 1H, $\text{C}=\text{CH}$), 8.25 (s, 1H, CH-4)</p>

Tabla 6. (Continuación)

 <p>(9 <i>E</i>)-1,3-Dimetil-5-(1-metil-1 H-imidazol-5-il)-9-[(1-metil-1 H-imidazol-5-il)metilen]-6,7,8,9-tetrahidropirimido[4,5-<i>b</i>] quinolin-2,4 (1H, 3H)-diona (15)</p>	<p>Espectro EM (IE) m/z: 417 M⁺ (100 %) M⁺-15 (30 %)</p> <p>IR en sol/CHCl₃ (cm⁻¹): 3137, 1131, 1105 (CH aromático), 1705, 1659, 1559 (C=O) 1475 (C-N)</p> <p>Espectro RMN ¹H (CDCl₃+DMSO) 300 Hz: δ 1.89 (q, <i>J</i>=5.28 Hz, 2H, CH₂CH₂CH₂), 2.27 (dt, <i>J</i>=17, 4.9 Hz, 2H, CH₂CH₂CH₂) 2.76 (dt, <i>J</i>= 17, 4.9 Hz, 2H, CH₂CH₂CH₂) 3.37 (s, 3H, CH₃), 3.44 (s, 3H, CH₃), 3.81(s, 3H, CH₃), 3.85 (s, 3H, CH₃), 7.03 (s, 1H, CH-4'), 7.13 (s, 1H, CH-4), 7.32 (s, 2H, CH-2,2'), 7.94 (s, 1H, C=CH)</p>
 <p>5-(1 <i>H</i>-indol-3-il)-1,3-dimetil-6,7,8,9-tetrahidropirimido[4,5-<i>b</i>] quinolin-2,4 (1H, 3H)-diona (16)</p>	<p>Espectro EM (IE) m/z: 360 M⁺ (100 %)</p> <p>IR en KBr (cm⁻¹): 3057 (CH Ar), 2932 (CH₂ saturado), 1700, 1650 (C=O), 1455 (C-N)</p> <p>Espectro RMN ¹H (CDCl₃+DMSO) 300 Hz: δ 1.59-1.70 (m, 2H, N=C-CH₂CH₂CH₂CH₂), 1.82-1.91 (m, 2H, N=C-CH₂CH₂CH₂CH₂), 2.40 (t, <i>J</i>= 6.9 Hz, 2H, N=CH CH₂CH₂CH₂CH₂), 3.00 (t, <i>J</i>=6.3 Hz, 2H, N=C-CH₂CH₂CH₂CH₂), 3.17 (s, 3H, CH₃), 3.24 (s, 3H, CH₃), 6.98 (td, <i>J</i>=6.9, 0.9 Hz, 1H, CH-5), 7.04 (d, <i>J</i>= 2.4 Hz, 1H, CH-2), 7.064 (t, <i>J</i>=7.8 Hz, 1H, CH-6), 7.145 (td, <i>J</i>=6.9, 1.2 Hz, 1H, CH-4), 7.46 (d, <i>J</i>=8.1 Hz, 1H, CH-7)</p>
 <p>(9 <i>E</i>)-1,3-Dimetil-5-(1 <i>H</i>-pirazol-5-il)-9-[(1 <i>H</i>-pirazol-5-il)metilen]-6,7,8,9-tetrahidropirimido[4,5-<i>b</i>] quinolin-2,4 (1H, 3H)-diona (17)</p>	<p>Espectro EM (IE) m/z: 389 M⁺ 2 (50%), M⁺ (15%), M⁺ -344 (100%)</p> <p>IR en KBr (cm⁻¹):3049, 759 (CH Ar), 2 946 (CH₂ saturado), 1707, 1652,1557 (C=O), 1438 (C-N)</p> <p>Espectro RMN ¹H (CDCl₃+DMSO) 300 Hz: δ 1.86 (q, <i>J</i>=5.6 Hz, 2H, CH₂CH₂CH₂), 2.53 (t, <i>J</i>=5.7 Hz, 2H, CH₂CH₂CH₂) 2.95 (t, <i>J</i>=5.42 Hz, CH₂CH₂CH₂) 3.35 (s, 3H, N-CH₃) 3.84 (s 3H, CH₃), 6.42 (d, <i>J</i>=2.31 Hz, 1H, CH-4'), 6.70 (d, <i>J</i>=2.28 Hz, 1H, CH-4), 7.87 (d, <i>J</i>=2.31 Hz, 1H, CH-5'), 7.93 (d, <i>J</i>=2.28 Hz, 1H, CH-5) 8.22 (s, 1H, C=CH)</p>

6.2 Parte biológica

Cultivo celular.- Las líneas celulares utilizadas fueron: HeLa (adenocarcinoma de cérvix), SW480 (adenocarcinoma colorrectal), C-33 (adenocarcinoma de cérvix), MCF7 (adenocarcinoma de glándula mamaria), K562 (leucemia). Se cultivaron en medio D-MEM (Gibco) complementado al 10% con suero fetal de bovino (Invitrogen), 10 mL de L-Piruvato (Gibco), 3.7 g de NaHCO₃, 2.2 g de HEPES (Sigma) y 100,000 u de antibiótico antimicótico (Gibco) que contienen 10,000 µg/mL de penicilina G sódica, 25 µg/mL de sulfato de estreptomina y anfotericina B en solución salina al 0.85%. Las células fueron crecidas en atmósfera húmeda a 37 °C y 5 % de CO₂.

Determinación de la citotoxicidad

Técnica del MTT.- Esta técnica es una de las más utilizadas y provee una forma rápida y fácil de medir la viabilidad celular, y se basa en la capacidad de las células viables de reducir el bromuro de 3-(4,5-dimetil tiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT), soluble en agua y de color amarillo, a un compuesto insoluble en agua y de color púrpura (formazán del MTT) que absorben un rango de 540-570 nm, de este modo, la reducción del MTT es directamente proporcional a la cantidad de células viables (Edmonson *et al*, 1988).

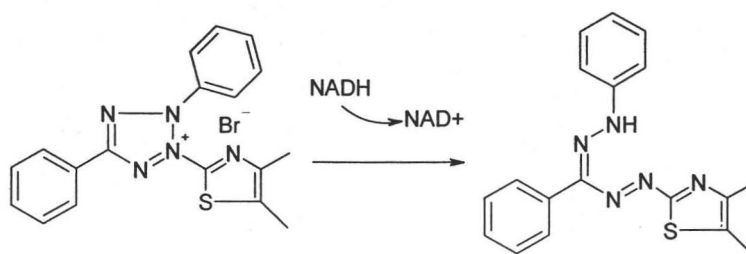


Figura 9. Reducción del MTT. La reducción se lleva a cabo en el anillo de tetrazolio, el cual se abre y la amina cuaternaria se modifica a una amina terciaria. Esta reducción es debida a las deshidrogenasas presentes en las células viables

La prueba de citotoxicidad fue llevada a cabo usando la técnica del MTT descrita, las células (4000-6000 por pozo) fueron cultivadas con medio D-MEM (Gibco) al 10 % de suero fetal bovino (Invitrogen) durante 24 horas en una atmósfera húmeda a 37 °C y 5 % de CO₂ en placas de cultivo de 96 pozos antes de que les fueran adicionados los

compuestos. Para adicionar los compuestos, estos fueron disueltos en dimetilsulfóxido (DMSO) y adicionados por dilución serial en un rango de concentraciones de 5-80 μM , cuidando que el DMSO agregado fuera $< 0.5 \%$ del volumen final en cada pozo 230 μM , después de 72 horas se agregó a cada pozo 20 μL de solución de MTT a una concentración de 5 mg/mL y se dejó en incubación durante cuatro horas, después de este tiempo se remueve el medio invirtiendo la placa y se extrajeron los cristales de formazán del MTT con 250 μL de DMSO y las placas se leyeron en un lector de Elisa a 550 nm. El porcentaje de células vivas se calculó con respecto a un control utilizando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ inhibición} = 100 * (1 - \text{Abs muestra} / \text{Abs control})$$

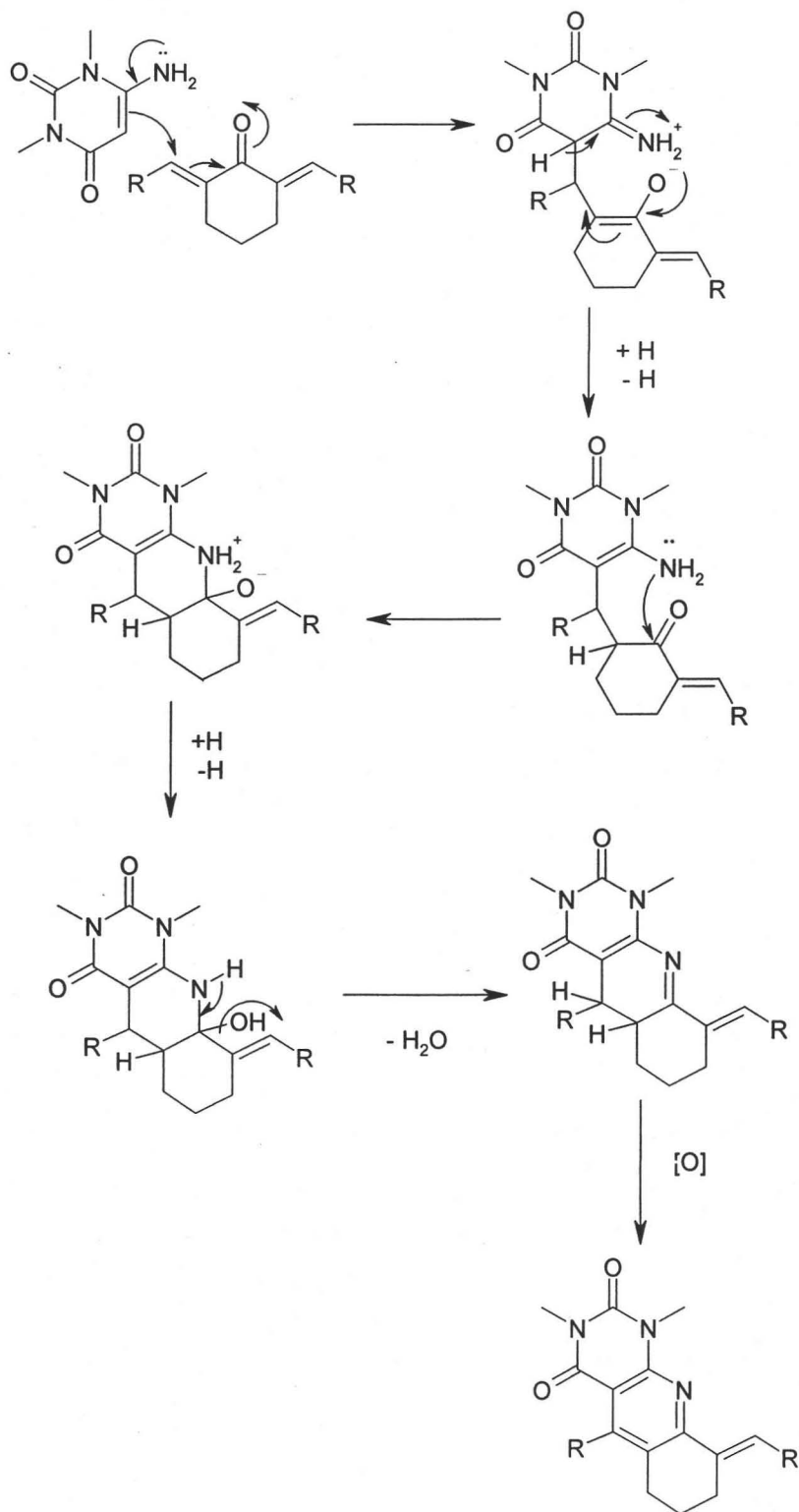
. La IC_{50} fue calculada a las 72 h de exposición a los compuestos preparados, en referencia a una curva estándar construida para células sin tratar.

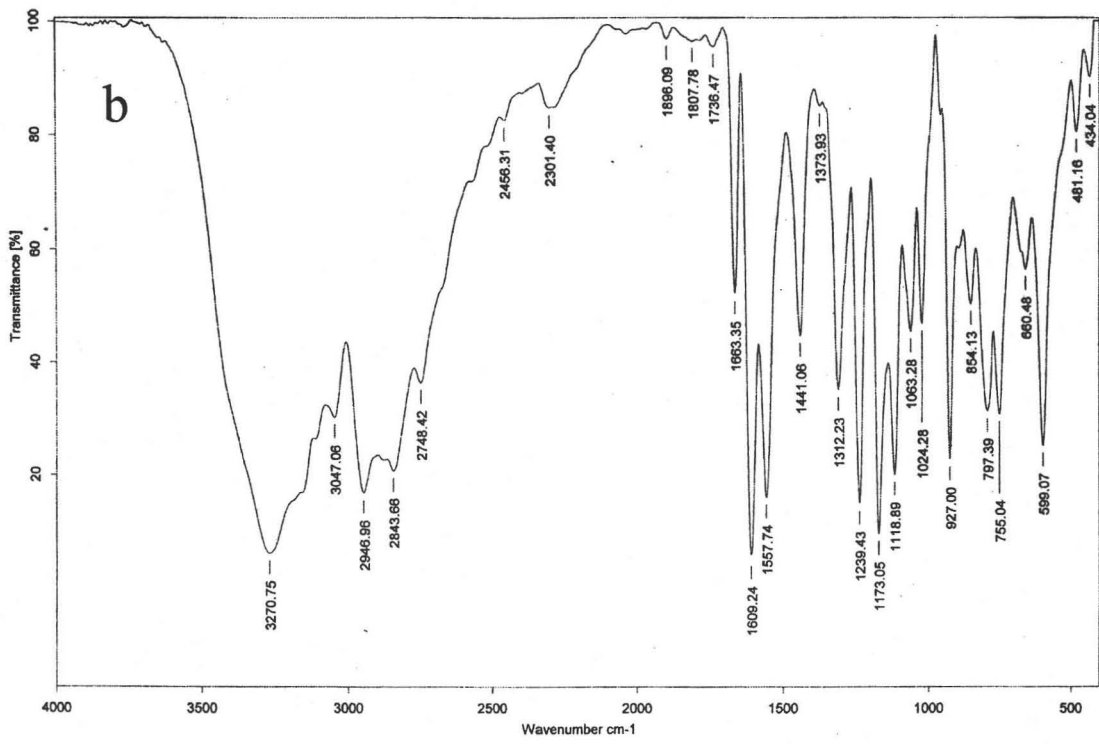
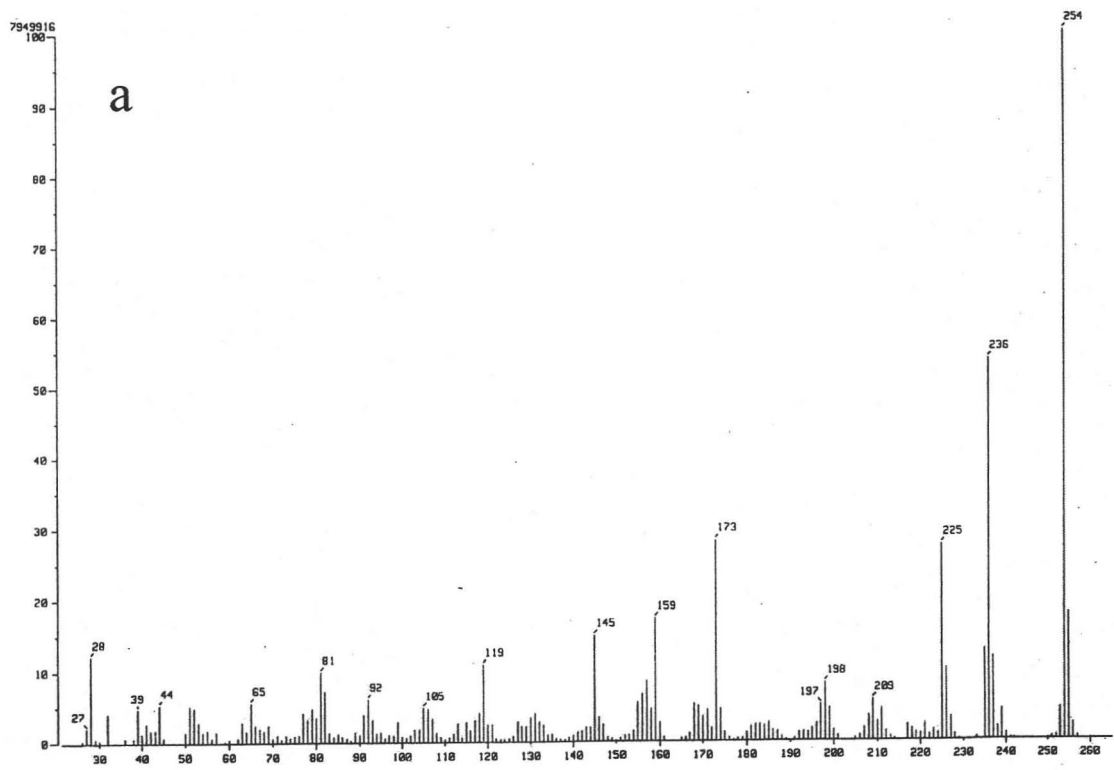
Análisis del ciclo celular

La citometría de flujo en la actualidad es una herramienta esencial para observar la distribución de las poblaciones celulares en su ciclo de vida y se fundamenta principalmente en la capacidad de los citómetros de separar las diferentes poblaciones celulares de acuerdo a la cantidad de yoduro de propidio que hayan incorporado y que es detectado gracias a su fluorescencia, esta fluorescencia, es directamente proporcional a la cantidad de ADN en cada célula.

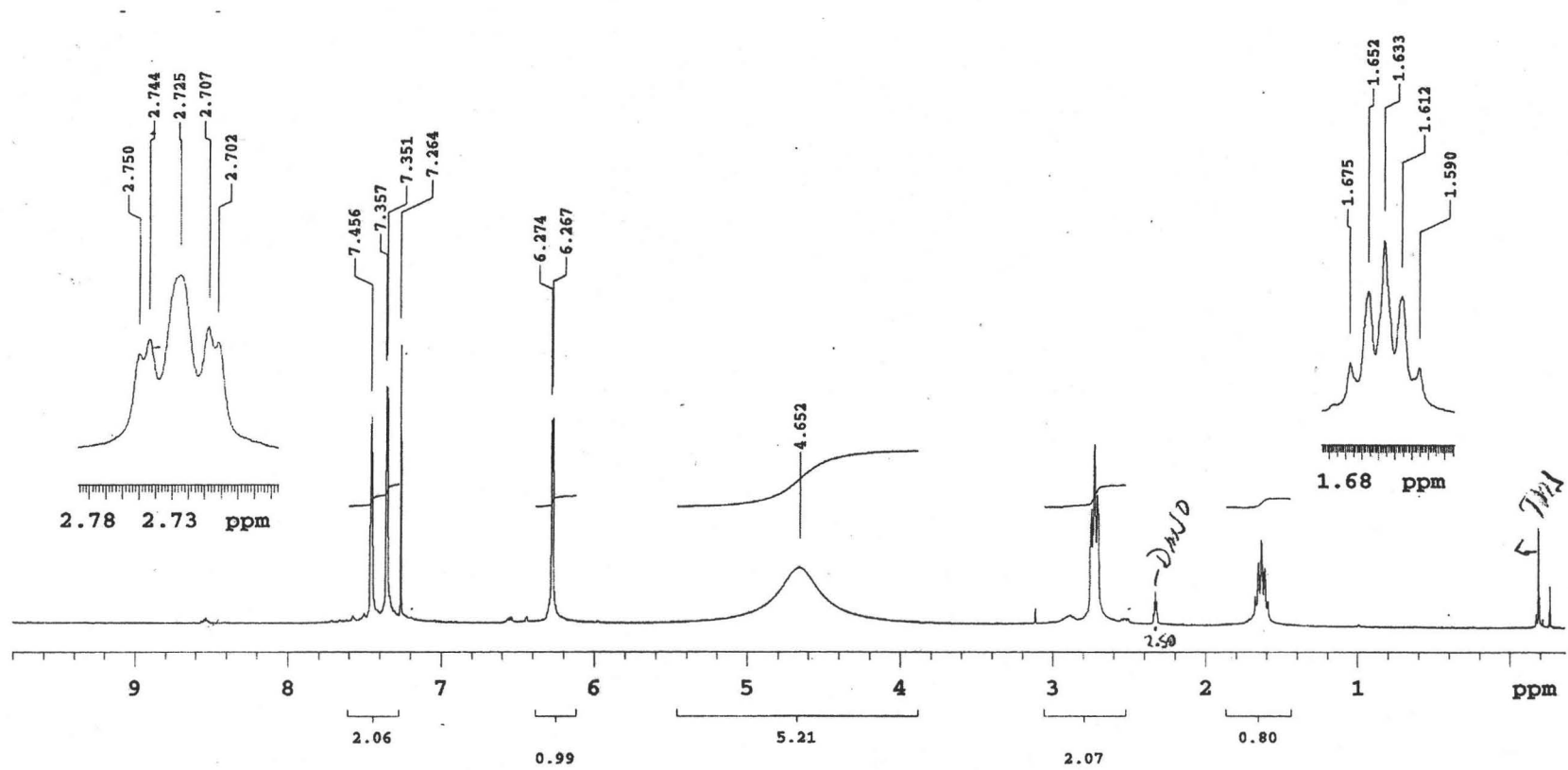
Las células fueron cultivadas durante 24 h a una concentración inicial de 10^6 células/10 mL en medio D-MEM (Gibco) y posteriormente el medio fue remplazado por medio fresco que contenía a los compuestos a probar en concentraciones de 0.5, 0.25, .125 y 0.0625 veces la IC_{50} . como controles se utilizaron un control para el vehículo DMSO, control sin tratar. Los compuestos fueron probados a 24, 48 y 72 h de exposición, después de las cuales las células fueron cosechadas, fijadas con etanol al 70 % y posteriormente teñidas con una solución de yoduro de propidio 50 $\mu\text{g/mL}$

Apéndice 1. Mecanismo de reacción propuesto para la adición de 6-amino 1,3-dimetiluracilo a las 2,6-diarilidenciclohexanonas (Díaz *et al*, 2003).

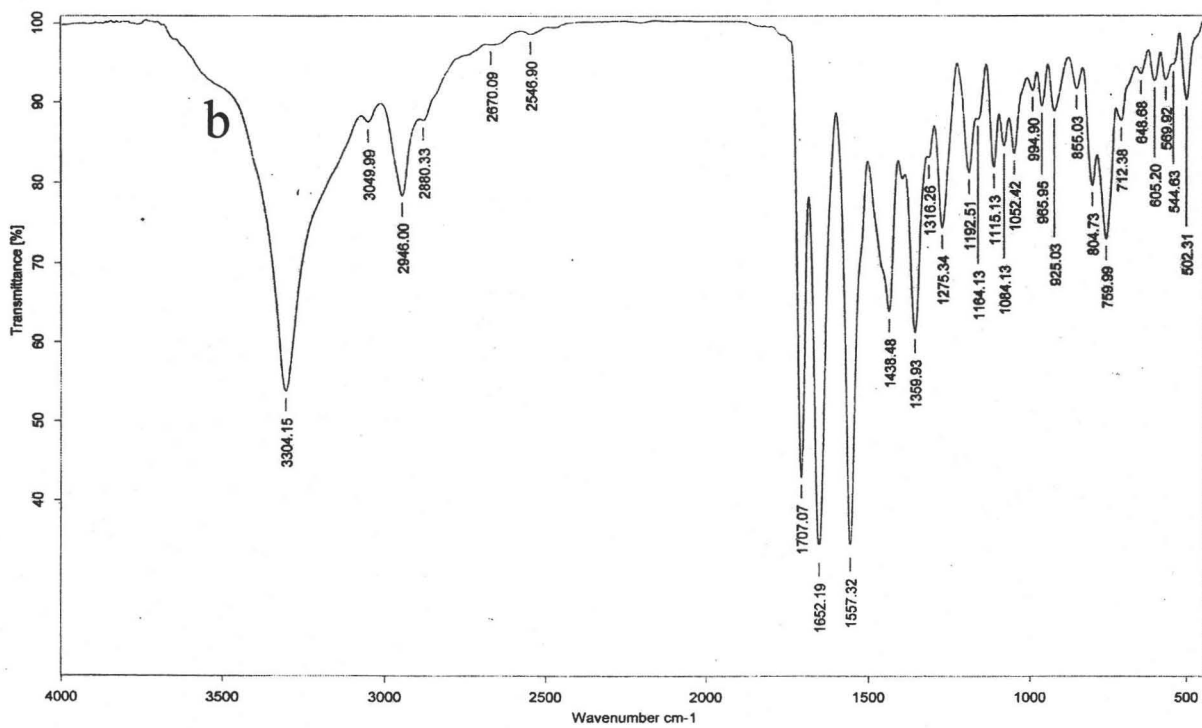
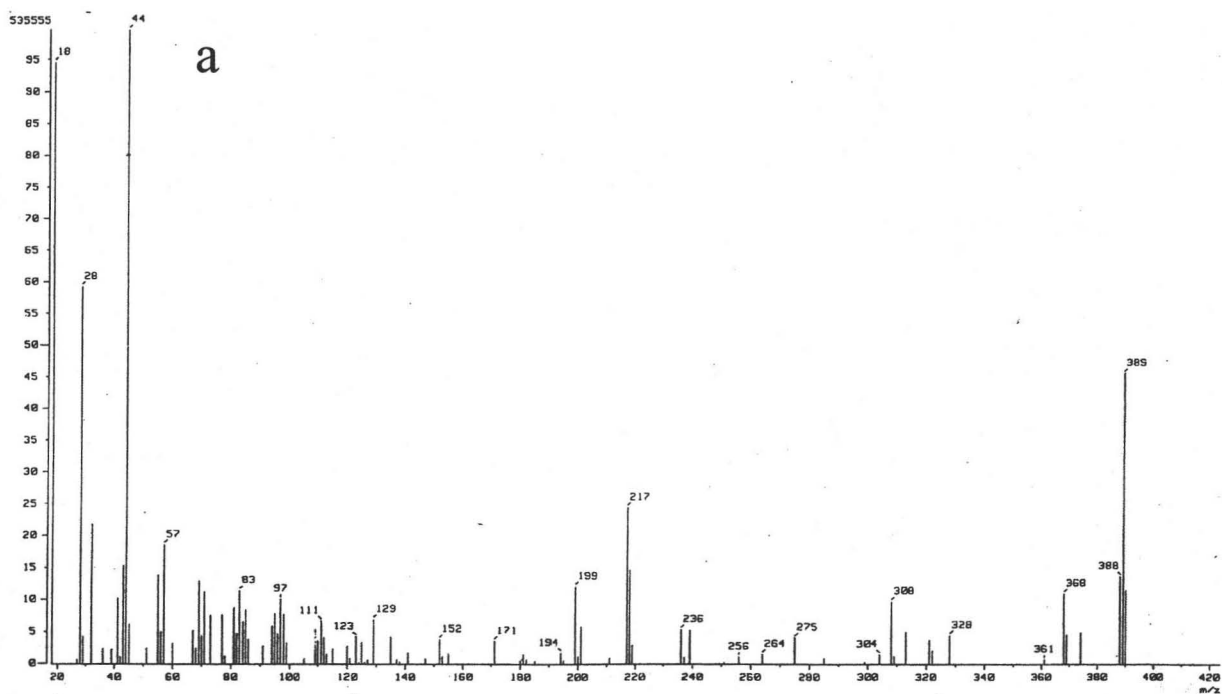




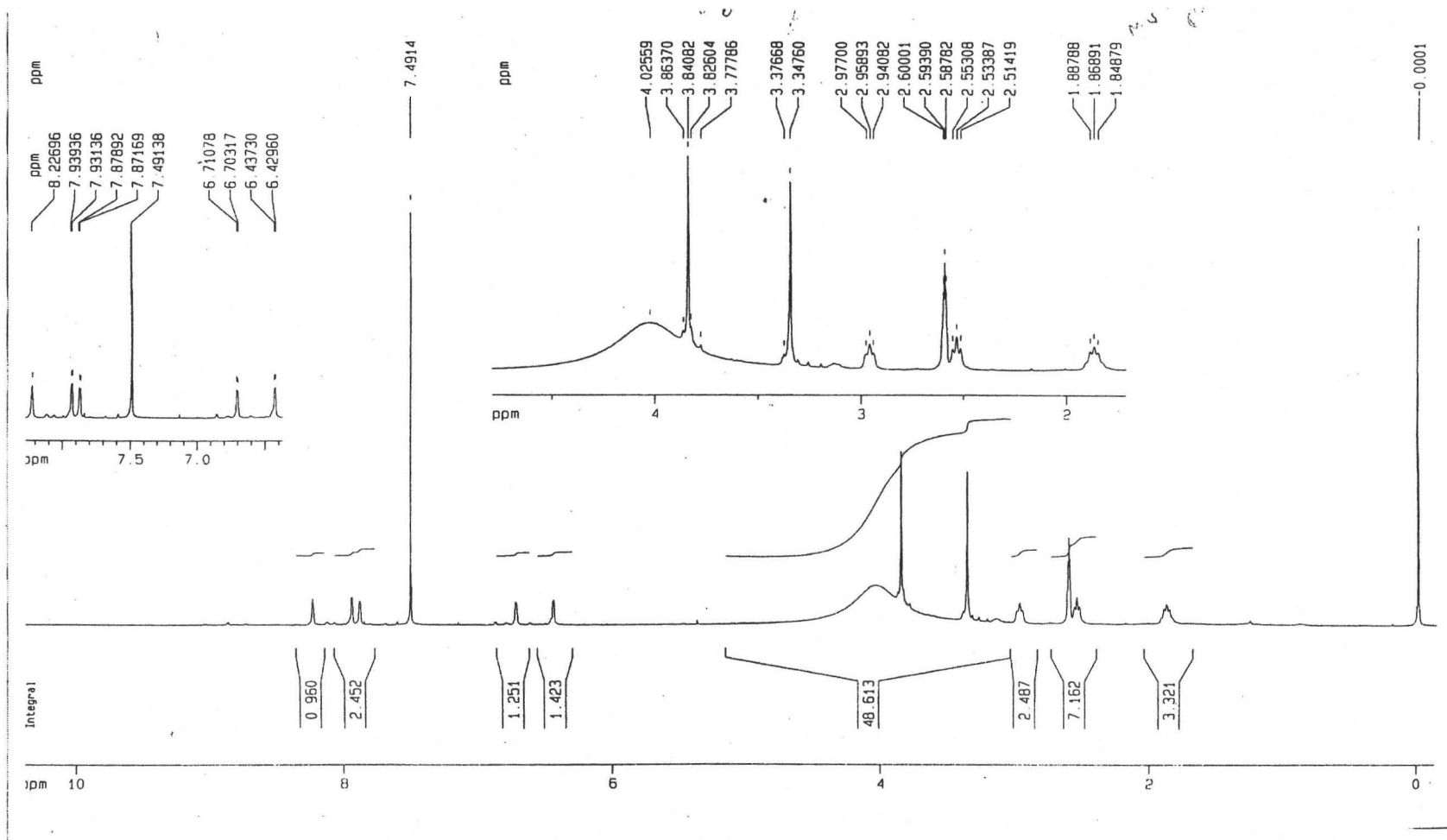
Apéndice 2. Espectros de (a) masas (Impacto Electrónico) (b) infrarrojo (pastilla) de la (2*E*,6*E*)-2,6-Bis(1*H*-3-pirazoliden)ciclohexanona (**9**).



Apéndice 3. Espectro de RMN ¹H de la (2E,6E)-2,6-Bis(1H-3-pirazoliden)ciclohexanona (9).



Apéndice 4. Espectros de (a) masas (Impacto Electrónico) (b) infrarrojo (pastilla) del compuesto 6,7,8,-Trihidro-9-(1*H*-pirazol-3-iliden)-1,3-dimetil-(1*H*-pirazil)-(1*H*, 3*H*)-pirimido[4,5-*b*] quinolin-2,4-diona (17).



Apéndice 3. Espectro de RMN ^1H del compuesto 6,7,8,-Trihidro-9-(1*H*-pirazol-3-iliden)-1,3-dimetil-(1*H*-pirazil)-(1*H*, 3*H*)-pirimido[4,5-*b*] quinolin-2,4-diona (17).

8. REFERENCIAS

- Abraham, R. T. **2001**. *Genes Dev.* 15: 2177-2196
- Bevan, P., Ryder, H. y Shaw, I. **1995**. *Trends Biotechnol.* 13:115-121.
- Bidere, N., H. K. Lorenzo, S. Carmona, M. Laforge, F. Harper, C. Dumont y A. Senik. **2003**. *J. Biol. Chem.* 278: 31401-31411
- Bin Yang, E., Y. Jian Guo, K. Zhang, Y. Zong Chen y P. Mack. **2001**. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1550:144-152
- Bois, F., C. Beney, A. Boumendjel, A. Mariotte, G. Conseil y A. Di Pietro. **1998**. *J. Med. Chem.* 41:4161-4164
- Boya, P., K. Andreau, D. Poncet, N. Zamzami, J. L. Perfettini, D. Metivier, D. M. Ojcius, M. Jäätelä y G. Kroemer. **2003**. *J. Exp. Med.* 197: 1323-1334
- Boyd, M. R. **1997**. The NCI *in vitro* anticancer drug discovery screen. In: *Anticancer Drug Development Guide: Clinical Trials, and Approval*
- Brennan, N., J. P. Hall, S. R. Davies, S. O. Golnick, A. R. Oseroff, S. L. Gibson, R. Hilf y M. R. Detty. **2002**. *J. Med. Chem.* 45:5123-5135
- Brown, J., M. y Giaccia, A., J. **1998**. *Cancer Res.* 55:2325-2333.
- Brunk, U. T. y I. Svensson. **1999**. *Redox. Rep.* 6: 91-97
- Chen, M. S., B. Christensen, J. Blom, E. Lemminch, L. Nadelman, K. Fich, T. G. Theander y A. Kharazmi. **1993**. *Antimicrob Agents Chemother* 37: 2550-2556
- Chen. Y., S. Shen, W. Lee, H. Lin, C. Ko, C. Shih y L. Yang. **2002**. *Arch Toxicol.* 76:351-359
- Cirman, T., K. Oresie, G. Droga Mazovee, V. Turk, J. C. Reed, R. M. Myers, G. S. Salvesen y B. Turk. **2003**. *J. Biol. Chem.* Online 27 de octubre
- Darnell, J y Fodish H. **1999**. *Molecular Cell Biology*, Capítulo 24 Cancer, 4^a ed. W. H. Freeman and Company, New York, pp 1054-1084.
- Díaz, E., H. Barrios, D. Corona, A. Guzmán, R. Díaz y A. Fuentes. **2002**. *Spectrochimica Acta part A.* 58: 2079-2087
- Díaz, E., H. Barrios, A. Guzmán, D. Corona, R. Díaz, A. Fuentes y C. K. Jankowski. **2000**. *Spectroscopy.* 14: 177-194
- Díaz, E., H. Barrios, J. L. Nava, R. G. Enríquez, A. Guzmán, L. León, J. F. Fuentes, A. Quintero y J. D. Solano. **1997**. *Heterocycl. Chem.* 34: 1037-1041

- Díaz, E., Guzmán, A., Toscano, R. A., Barrios, H., Corona, D., Fuentes, A., Díaz, R., Martínez, E. C., Quintero, A. **2003**. *Spectrochimica Acta part A*. 59:1307-1320
- De Vicenzo, R., C. Ferlini, M. Distefano, C. Gaggini, A. Riva, E. Bombardelli, P. Morazzoni, P. Valenti, F. Belluti, F. O. Ranelletti, S. Mancuso y G. Scambia. **2000**. *Cancer Chemother Pharmacol*. 46: 305-312
- Ducki, S., J. A. Hadfield, L. A. Hepworth, N. J. Lawrence, C. Liu y A. T. Mc Gown. **1997**. *Bioorganic & Medical Chemistry Letters*. 7 (24): 3091-3094
- Ducki, S., J. A. Hadfield, N. J. Lawrence, C. Liu, A. T. Mc Gown y X. Zhang. **1996**. *Planta Medica*. 62:185-186
- Dulbecco, R.. La naturaleza del cáncer, **1983** *Mundo Cient*. 3(22):168-179.
- Edwards, M. L., D. M. Stemerick y P. S. Sunkara. **1990**. *J. Med. Chem*. 33:1948-1954
- Foghsgaard, L. D., Wissing, D. Mauch, U. Lademann, L. Bastholm, M. Boes, F. Elling, F. Leist y M. Jäättelä. **2001**. *J. Cell Biol*. 153: 999-1009
- Gottesman, M. M. e I. Pastan. **1993**. *Annu. Rev. Biochem*. 62:385-427
- Greenwald, P. **1996**. *Chemoprevention of cancer. Sci. American*. 275:64-67
- Guengerich, F. R. **1998**. *Cancer Res*. 48: 2946-2954
- Hadjeri, M., M. Barbier, X. Ronot, A. Mariotte, A. Boumendjel y J. Boutonnat. **2003**. *J. Med. Chem*. 46:2125-2131
- Hayflick, L. y Moorhead, P. S. **1961**. *Exp. Cell Res*. 25:585-590
- Herencia, F., M. L. Ferrándiz, A. Ubeda, J. N. Domínguez, J. E. Charris, G. M. Lobo y M. J. Alcaraz. **1998**. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 8: 1169-1174
- Higgins, C. F. **1992** *Annu. Rev. Cell. Biol*. 8:67-113
- Hokosawa, N., Y. Hokosawa, T. Sakai, M. Yoshida, N. Marui, H. Nishino, K. Kawai y A. Aoike. **1990**. *Int. J. Cancer*. 45:1119-1124
- Hsieh, H. K., T. H. Lee, J- P. Wang, J. J Wang y C. N. Lin. **1998**. *Pharmaceutical Research*. 10: 15-39
- IARC monographic. **1995**. Tobacco smoking. *Eval. Carcinog. Risks Human*. 38
- Iwashita, K., M. Kobori, K. Yamaki y T. Tsushida. **2000**. *Biosci Biotechnol Biochem*. 64 (9):1813-1820
- Jäättelä, M. y J. Tschopp. **2003**. *Nat. Immunol*. 4: 416-423

- Jäättelä, M. **2004**. *Oncogene*. 23: 2746-2756
- Kintzios, E. y Barberaki, G. **2004**. Plants that fight cancer. USA. pp 1-14
- Koepp, D. M. 1999. *Cell* 97:431-434
- Kumar, S. K., E. Hager, C. Pettit, H. Gurulingappa, N. E. Davidson y S. R. Khan. **2003**. *J. Med. Chem.* 46:2813-2815
- Lawrence, N. J., A. T. Mc Gown, S. J. Ducki y J. A. Hadfield. **2000**. *Anti-Cancer Drug Design*. 15:135-141
- Leist, M. y M. Jäättelä. **2001**. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2: 589-598
- Lewin, B. **1997**. Genes VI, cap. 37 Oncogenes and Cancer pp 1131-1172, Oxford University Press, Oxford.
- Li, R., G. L. Kenyon, F. E. Cohen, X. Chen, B. Gong, J. N. Domínguez, E. Davidson, G. Kurzban, R. E. Miller, E. O. Nuzum, P. J. Rosenthal y J. H. McKerrow. **1995**. *J. Med. Chem.* 38: 5031-5037
- Liu, M., P. Wilairat y M. Go. **1998**. *J. Med. Chem.* 41: 4819-4832
- Makita, H., T. Tanaka, H. Fujitsuka, N. Tatematsu, K. Satoh, A. Hara y H. Mori. **1996**. *Cancer Research*. 56:4904-4909
- Marshall, C. J. **1991**. *Cell*. 64:313-326.
- Matsukawa, Y., N. Marui, T. Sakai, Y. Satomi, M. Yoshida, K. Matsumoto, H. Nishino y A. Aoike. **1981**. *Cancer Res* 22: 123-1243
- Monostory, K., V. Tamási, L. Vereczkey y P. Perjési. **2003**. *Toxicology*. 184:203-210
- Musacchio, A. y K. B. Hardwick. **2002**. *Nat rev. Mol. Cell. Biol.* 3: 361-741
- Nicotera, P. y G, Melino. **2004**. *Oncogene*. 23: 2757-2765
- Nylandsted, J., W. Wick, U. A. Hirt, K. Brand, M. Rohde, M. Leist, M. Weller y M. Jäättelä. **2002**. *Cancer Res*. 62: 7139-7142
- Qian, B. **1987**. Clinical Effects of Anticancer Chinese Medicine, Shanghai Translation Publishing House. 21:34-47
- Paulovich. **1997**. *Cell*. 88: 315-321
- Quintero, A., Pelcastre, A. y Dolores, S. J. **1999**. *J. Pharm. Pharmaceut. Sci.* 2 (3):108-112
- Rubenstein, E. Y Federmann, D. D. editores. **1997**. *Scientific American Medicine*. Vol 5, sección 13, Oncología, USA. pp 11-17

- Satomi, Y. **1993**. *Int. J. cancer*. 55:506-514
- Sherr, C. J. y J. M. Roberts. **1999**. *Genes Dev*. 13: 1501-1512
- Smits, V. A y R. H. Medema. **2001**. *Biochim Biophys Acta*. 1519: 1-12
- Soulinna, E. M., R. N. Buchbaum y E. Racker. **1975**. *Cancer Research*. 35:1865-1872
- Stewart, Z. A. y J. A. Pietenpol. **2001**. *Chem. Res. Toxicol*. 14: 243-263
- Stewart, Z. A., M. D. Westfall y J. A. Pietenpol. **2003**. *Trends in pharmacological sciences*. 23: 1342-1350
- Sugimura, T. **1986**. *Environ. Health Perspect*. 67:5-10
- Sugimura, T. **1996**. *Eur J. Cancer Prev*. 5:1-8
- Tolkovski, A. M., L. Xue, G. C. Fletcher y V. Borutaite. **2002**. *Biochimie*. 84: 233-240
- Wakabayashi, K., Totsuka, Y., Fukutome, K., Oguri, A., Ushiyama, H. y Sugimura, T. **1997**. *Mutat. Res*. 376 (1-2):253-259
- Xia, Y., Z. Yang, P. Xia, K. F. Bastow, Y. Nakanishi y K. Lee. **2000**. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 10:699-701
- Yang, E. B., D. F. Wang, L. Y. Cheng y P. Mack. **1997**. *Cancer*. 10:319-324
- Yoshida, M. T. Sakai, W. Hosokawa, N. Marui, K. Matsumoto, A. Fugioka, H. Nishino y A. Aoike. **1990**. *Febs Lett*: 260:10-13
- Zheng, L. y W. H. Lee. **2001**. *Exp. Cell. Res*. 264: 3-18