



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

“Síntesis de β -carbolicinas como agentes
citotóxicos potenciales”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACEÚTICA BIÓLOGA

P R E S E N T A

ROCIO MONTSERRAT AGUILAR CRUZ



MÉXICO, D. F.

2011



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

JURADO ASIGNADO:

Presidente:	Dra. Ofelia Espejo González
Vocal:	M. en A. Rosa Luz Cornejo Rojas
Secretario:	Dra. Hortensia Parra Delgado
1er. Suplente	Dra. Elena Guadalupe Ramírez López
2do. Suplente:	M. en C. Nayeli López Balbiaux

El presente trabajo se realizó en el laboratorio 1-4, del Departamento de Productos Naturales, Instituto de Química, UNAM.

Dra. Hortensia Parra Delgado

Asesor

Rocio Montserrat Aguilar Cruz

Sustentante



AGRADECIMIENTOS

A la Doctora Hortensia Parra Delgado por su gran apoyo académico y personal, por su interés en que se aprenda en el laboratorio, por su amistad, paciencia y comprensión.

A César Vega y a Mitchell Gary Guzmán, por su colaboración en la síntesis, su apoyo y compañía en el laboratorio.

A los técnicos, M. en C. Héctor Ríos, Dra. Beatriz Quiroz, Q. Ángeles Peña, M. en C. Elizabeth Huerta, Dra. Isabel Chávez, M. en C. Nieves Zavala, Dr. Rubén Gaviño, Q. F. B. Rocío Patiño, Q. Eréndira García, M. en C. Carmen Márquez, Dr. Javier Pérez y I. Q. Luis Velasco por su invaluable asistencia en la realización de los análisis espectroscópicos, espectrométricos y de análisis cromatográfico de alta resolución. M. en C. Teresa Ramírez por su asistencia en la determinación de la actividad citotóxica de los compuestos sintetizados en este estudio.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, a su Instituto de Química y Facultad de Química.



DEDICATORIAS

Dedico este trabajo a todas las personas que han estado conmigo desde el principio y a lo largo de mi vida, familia, maestros y amigos que han ayudado a que hoy sea lo que soy.

A mi papá, porque es mi mejor ejemplo de que en la vida uno pueda llegar hasta donde se propone aún cuando las circunstancias no sean las mejores, porque creo que no hay nada que no sepa o pueda hacer y porque estoy segura que pase lo que pase siempre se puede contar con él.

A mi mamá porque se esforzó mucho para cuidarnos y no morir de un susto o un coraje con tantos de nuestros accidentes y travesuras, porque con todo y sus muchos regaños es por ella que tengo este carácter que me ha ayudado a llegar hasta aquí y seguir mas para adelante y al igual que mi papá siempre se cuenta con ella.

A mis hermanos Uriel y Yonatan por todo lo que hemos vivido que es mucho para resumir en una página, solo diré que no hay nada mejor que haber crecido juntos, a Chuy y Charly que son mis primos pero los siento como hermanos; cada uno de ustedes cuatro es muy diferente pero yo los quiero igual.

A toda mi familia en especial a mis abuelitos, Mon, Cata, Rita y Cuco, a mis tios Pepe, Fili, Miguel, Chelo, Mari, y Rafa, a mis primos Josue, el Rino y los Tinos, Jorge, Lupis y Rafita.

A mis amigos de Villa con los que he pasado tantas cosas, han pasado tantos años y siguen siendo los mismos, Miyuki sabes que más que una amiga eres una hermana, desde hace 10 años ha sido así y siempre seguirá siendo igual porque de verdad te aprecio, junto con Pool y Gallo hemos pasado muchas cosas y como todo buen grupo de rock somos un cuarteto que no es lo mismo si alguno falta.

A los del CCH, Chang, España, Merol, Perla, Maria, Sello, Koko, etc., porque con ellos he pasado las cosas más graciosas, las más extrañas y las más feas, juntos y siempre con el apoyo del otro; Boo, Piña y Ana nos enseñaron que en



ocasiones la muerte es solo la suerte con una letra cambiada y que la vida no es tan buena como uno quisiera pero hay que encontrarle el mejor color.

A todos los amigos de la facultad que hicieron que cuatro años parecieran cuatro meses, Jacke, Sam, Peter, Carlos, Enfermis, Torta, Lukoka, Ivan, Bostik, y muchos más de los que podría contar toda una historia pero no tengo el espacio.

A Payo que parece que conocerla fue cosa del destino, para bien, siempre has sido una buena amiga y siempre me has apoyado y dado ánimos y eso te lo agradezco, eres una buena persona Pay y por eso todos te quieren.

A Zupis que se ha divertido conmigo, llorado y algunas veces cuando tenía que hacerlo me ha regañado, siempre es reconfortante platicar con ella, Zuro, yo se que muchas veces te desesperé y lo sigo haciendo, pero ahora considero que eres una de mis mejores amigas y lo serás siempre, aunque te vistas mucho de rosa, seas cursi y me molestes queriendo regalarme globos el 14 de febrero.

A Macy mi amiga y mi hermana, juntas nos hemos desvelado platicando o estudiando, nos hemos hecho la pregunta que cualquiera se haría alguna vez en la vida “¿cómo sería vivir con un chino?”, cruzamos ríos en los que aprendimos que no hay que reírse mientras se nada contra la corriente, nos salvamos de aquel abismo, me abriste tu casa de manera que ya tengo ahí hasta mi cepillo de dientes y una pijama, en fin, te quiero Macy.

Y por último pero no menos importante, a Marko, sé que no te gustan las menciones pero eres también parte de mi vida hasta ahora y bien merece la pena, siempre me apoyas, ayudas y me haces ver que no todo tiene que ser siempre como yo lo digo, he aprendido muchas cosas y hay que seguir aprendiendo.



ÍNDICE GENERAL

	pág.
1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	2
3. MARCO TEÓRICO	5
3.1 Algunos aspectos sobre el cáncer	5
3.1.1. Etiología.....	5
3.1.2. Control del ciclo celular.....	7
3.2 Productos naturales y cáncer	9
3.2.1. Interacción de PN con el ADN	10
3.2.1.1. Intercalación.....	11
3.2.1.2. Unión al surco menor.....	11
3.2.1.3. Unión al surco mayor	12
3.2.2. Inhibidores de las ADN Topoisomerasas.....	12
3.2.3. Acción sobre blancos específicos	14
3.3. β -Carbolinas	14
3.3.1. Biosíntesis de alcaloides β -carbolínicos	16
3.3.2. Síntesis de β -carbolinas.....	18
3.3.2.1. Reacción de Pictet-Spengler	18
3.3.2.1.1. <i>Características generales de la reacción</i>	19
3.3.2.1.2. <i>Mecanismo de reacción</i>	19
3.3.3. Actividad biológica de β – Carbolinas	21
3.3.3.1. Actividad citotóxica	21
3.3.3.1.1. <i>Acción sobre CDK's</i>	23
3.3.3.1.2. <i>Acción sobre cinesina Eg5</i>	24
3.3.3.1.3. <i>Acción sobre NF-κB</i>	26
3.3.3.2. Actividad genotóxica	26
3.3.3.3. Actividad en el SNC	28
4. HIPÓTESIS	30
5. OBJETIVOS	31
5.1. Objetivo general.....	31



5.2. Objetivos particulares	31
6. METODOLOGÍA	32
6.1 Aspectos generales	32
6.2 Síntesis	35
6.2.1. Síntesis del dímero de dicloro (η^6 -bencen) rutenio.....	35
6.2.2. Síntesis del ácido carbetohipirúvico.....	35
6.2.3. Compuesto C-A. Síntesis del éster metílico del L-Triptófano.....	36
6.2.4. Compuesto C-B. Síntesis del éster metílico del D-Triptófano.....	37
6.2.5. Compuesto C1. Síntesis de la 1,2,3,4-tetrahidro- β -carbolina.....	38
6.2.6. Compuesto C2. Síntesis de (<i>rac</i>) 1-metil-1,2,3,4-tetrahidro- β -carbolina.	39
6.2.7. Compuesto C3. Síntesis de la 1-metil- β -carbolina.....	40
6.2.8. Compuesto C4. Síntesis de (<i>rac</i>) 1-(2-etoxi-2-oxoetil)-1,2,3,4-tetrahidro- β -carbolina. .	40
6.2.9. Compuesto C4a. Síntesis de 1-(2-etoxi-2-oxoetil)-3,4-dihidro- β -carbolina.....	42
6.2.10. Compuesto C4b. Síntesis 1 <i>R</i> -(2-etoxi-2-oxoetil)-1,2,3,4-tetrahidro- β -carbolina.	43
6.2.11. Compuesto C4c. Síntesis del 1 <i>R</i> -(2-etoxi-2-oxoetil)-2-benciloxicarbonil-1,2,3,4-tetrahidro- β -carbolina.	44
6.2.12. Compuesto C5. Síntesis de 1 <i>R</i> -(2-etoxi-2-oxoetil)-2-benciloxicarbonil-9- <i>tert</i> -butiloxicarbonil-1,2,3,4-tetrahidro- β -carbolina.....	45
6.2.13. Compuesto C6. Síntesis del ácido 1,2,3,4-tetrahidro- β -carbolin-3 <i>S</i> -carboxílico.	46
6.2.14. Compuesto C7. Síntesis del ácido 1-metil-1,2,3,4-tetrahidro- β -carbolin-3 <i>S</i> -carboxílico.	47
6.2.15. Compuesto C8. Síntesis de ácido 1-(2-etoxi-2-oxoetil)-1,2,3,4-tetrahidro- β -carbolin-3 <i>S</i> -carboxílico.	48
6.2.16. Compuesto C9. Síntesis del éster metílico del ácido 1,2,3,4-tetrahidro- β -carbolin-3 <i>S</i> -carboxílico.	49
6.2.17. Compuesto C10. Síntesis del éster metílico del ácido 1-metil-1,2,3,4-tetrahidro- β -carbolin-3 <i>S</i> -carboxílico.....	50
6.2.18. Compuesto C11. Síntesis del éster metílico del ácido 2-benciloxicarbonil-1,2,3,4-tetrahidro- β -carbolin-3 <i>S</i> -carboxílico.....	51
6.2.19. Compuesto C12. Síntesis del ácido 1,2,3,4-tetrahidro- β -carbolin-3 <i>R</i> -carboxílico.....	52
6.2.20. Compuesto C13. Síntesis del ácido 1-metil-1,2,3,4-tetrahidro- β -carbolin-3 <i>R</i> -carboxílico.	52



6.2.21. Compuesto C14. Síntesis de ácido 1-(2-etoxi-2-oxoetil)-1,2,3,4-tetrahidro- β -carbolin-3R- carboxílico.....	53
6.2.22. Compuesto C15. Síntesis del éster metílico del ácido 1,2,3,4-tetrahidro- β -carbolin-3R- carboxílico.....	53
6.3. Evaluación de la actividad citotóxica de las β -carbolinas en líneas celulares de cáncer humano por el método de sulforrodamina B.	55
6.3.1. Fundamento del método analítico.....	55
6.3.2. Compuestos de prueba.....	55
6.3.3. Líneas celulares.....	55
6.3.4. Evaluación.....	56
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	57
8. CONCLUSIONES.....	67
9. PERSPECTIVAS.....	68
10. BIBLIOGRAFIA.....	69
11. ANEXOS.....	72



ÍNDICE DE FIGURAS

	pág.
Figura 1. Síntesis de β -carbolinas por medio de una ciclación de Pictet-Spengler.....	1
Figura 2. Modelo de los cambios genéticos y la progresión del cáncer de colon.....	6
Figura 3. El ciclo celular y las ciclinas y cinasas dependientes de ciclinas (CDK) asociadas.....	8
Figura 4. Sitios de interacción de pequeñas moléculas con el ADN	10
Figura 5. Inhibición de las ADN topoisomerasas.....	13
Figura 6. Esqueleto de tetrahidro- β -carbolina.....	14
Figura 7. Estructura química de algunas dihidro- β -carbolinas y β -carbolinas naturales.....	15
Figura 8. Estructura química de tetrahidro- β -carbolinas y β -carbolinas halogenadas.....	15
Figura 9. Biosíntesis de alcaloides indólicos.	17
Figura 10. Pictet-Spengler. Síntesis de Isoquinolinas.....	18
Figura 11. Pictet-Spengler. Síntesis de tetrahidro- β -carbolinas	19
Figura 12. Pictet-Spengler. Mecanismo de reacción	20
Figura 13. Estructuras químicas de MPP ⁺ , 9-metil- β -carbolina x HCl y yoduro de 2,9-dimetil- β -carbolinio.....	28
Figura 14. Esquema general de reacciones. Derivados de Triptamina	33
Figura 15. Esquema general de reacciones. Derivados de Triptófano	34
Figura 16. Síntesis del dímero de dicloro (η^6 -bencen) rutenio.....	35
Figura 17. Síntesis del ácido carboxipirúvico.....	35
Figura 18. Síntesis del éster metílico del L-Triptófano.....	36
Figura 19. Síntesis del éster metílico del D-Triptófano.....	37
Figura 20. Síntesis del compuesto C1.	38
Figura 21. Síntesis del compuesto C2.	39
Figura 22. Síntesis del compuesto C3.	40
Figura 23. Síntesis del compuesto C4.	41
Figura 24. Síntesis del compuesto C4a.	42
Figura 25. Síntesis del compuesto C4b.	43
Figura 26. Cromatograma de (1 <i>R</i>)-(2-etoxi-2-oxoetil)-1,2,3,4-tetrahidro- β -carbolina.....	44
Figura 27. Síntesis del compuesto C4c.....	44
Figura 28. Síntesis del compuesto C5.	45



Figura 29. Síntesis del compuesto C6.	46
Figura 30. Síntesis del compuesto C7.	47
Figura 31. Síntesis del compuesto C8.	48
Figura 32. Síntesis del compuesto C9.	49
Figura 33. Síntesis del compuesto C10.	50
Figura 34. Síntesis del compuesto C11.	51
Figura 35. Síntesis del compuesto C12.	52
Figura 36. Síntesis del compuesto C13.	52
Figura 37. Síntesis del compuesto C14.	53
Figura 38. Síntesis del compuesto C15.	54
Figura 39. Citotoxicidad de las Tetrahydro- β -carbolinas y β -carbolinas sintetizadas, en células de cáncer humano a una concentración de 50 μ M.	62
Figura 40. Sensibilidad de las líneas celulares de cáncer humano a los compuestos obtenidos.	63
Figura 41. Citotoxicidad de los compuestos análogos a la triptamina, con respecto a la sustitución en R ¹ a una concentración de 50 μ M.	64
Figura 42. Citotoxicidad de algunos compuestos cuya diferencia es en la sustitución en R ² a una concentración de 50 μ M.	65
Figura 43. Citotoxicidad con respecto a la sustitución en R ² y R ¹ = CH ₃ a una concentración de 50 μ M.	66
Figura 44. Citotoxicidad, a una concentración de 50 μ M, de los compuestos que poseen un sustituyente -CH ₂ CO ₂ Et en posición 1 y cuya diferencia radica en la sustitución en R ²	66



ÍNDICE DE CUADROS

	pág.
Cuadro 1. Tiempo de retención (T.R), área bajo la curva (ABC) y radio diastereoisomérico (<i>rd</i>) de la mezcla C7.	48
Cuadro 2. Tiempo de retención (T.R), área bajo la curva (ABC) y radio diastereoisomérico (<i>rd</i>) de producto C8.	49
Cuadro 3. Tetrahidro- β -carbolinas sintetizadas.....	57
Cuadro 4. Peso molecular, punto de fusión y rendimiento de las tetrahidro- β -Carbolinas sintetizadas.....	58
Cuadro 5. Citotoxicidad de las Tetrahidro- β -carbolinas en líneas celulares cancerosas humanas a una concentración de 50 μ M.....	61



ABREVIATURAS

CDK: cinasa dependiente de ciclina

NF- κ B: factor nuclear κ B

PN: productos naturales

SNC: sistema nervioso central

Topo I: topoisomerasa I

Topo II: topoisomerasa II

H: hermano

NH: norhermano

T.A: temperatura ambiente

THF: tetrahidrofurano

NEt₃: trietilendiamina

Boc: *tert*-butiloxicarbonilo

Cbz: benciloxicarbonilo

DMAP: 4-dimetilaminopiridina

DCM: diclorometano

CCF: cromatografía en capa fina

@: agitación

1. RESUMEN

El cáncer es un problema de salud a nivel mundial; se le atribuyen el 13% de las defunciones mundiales ocurridas en 2007 y en México es considerado como un problema prioritario siendo de las principales causas de muerte, solamente por debajo de los decesos causados por las enfermedades del sistema circulatorio y las enfermedades endocrinas, nutricionales y metabólicas. De lo anterior resulta imprescindible la búsqueda de nuevos agentes anticáncer. En la frecuente búsqueda de compuestos de origen natural, las tetrahydro- β -carbolinas, dihydro- β -carbolinas y β -carbolinas y/o sus derivados han mostrado poseer actividad citotóxica, la cual se ha atribuido a su intercalación con el ADN, su inhibición de las topoisomerasas I y II y/o actuando como reguladores de CDK, cinesina 5 (Eg5) y NF- κ B. Tomando en cuenta lo anterior, se propuso la síntesis de 14 tetrahydro- β -carbolinas y una β -carbolina empleando como sustratos la triptamina o el aminoácido correspondiente mediante una ciclación del tipo Pictet-Spengler obteniendo rendimientos moderados. (Fig. 1). Así, la actividad citotóxica de los compuestos obtenidos (y/o mezclas, según sea el caso) se evaluó empleando el modelo de sulforrodamina B. Como resultado, se determinó que dos de los compuestos obtenidos presentaron alta actividad, pero baja selectividad. La actividad citotóxica de los compuestos no dependió de manera absoluta de la planaridad de la molécula, sin embargo, dependió de la configuración en la posición 3; así como del sustituyente en la posición 1. Además, se obtuvo un compuesto (C12), un racemato (C4) y una mezcla diastereoisomérica (C8) con una alta selectividad hacia cáncer de mama (MCF-7).

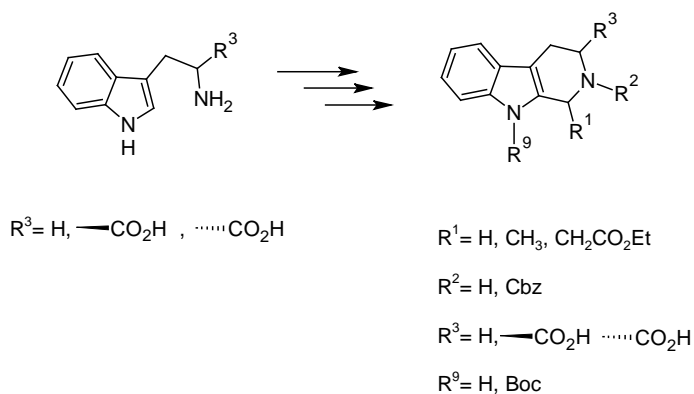


Figura 1. Síntesis de β -carbolinas por medio de una ciclación de Pictet-Spengler



2. INTRODUCCIÓN

La existencia del cáncer se conoce desde la antigüedad, en los viejos manuscritos de Egipto y de la India ya se habla de tumores ulcerados e incluso se han encontrado momias con tumores óseos. A pesar de ello, tan solo recientemente la sociedad ha tomado conciencia del terrible impacto que supone la elevada frecuencia y mortalidad del cáncer (Díaz-Rubio & García-Conde, 2002).

Actualmente representa una de las principales causas de muerte a nivel mundial, se le atribuyen 7.9 millones de defunciones (o aproximadamente el 13% de las defunciones mundiales) ocurridas en 2007 y aproximadamente el 72% de estas defunciones se registraron en países de ingresos bajos y medianos (entre los que se encuentra México). Se prevé que el número de defunciones anuales mundiales por cáncer seguirá aumentando y llegará a unos 12 millones en 2030 (WHO, 2011).

En México, durante 2007 el cáncer representó la tercera causa de muerte entre las mujeres con 35 303 defunciones (15.4%), mientras en los hombres fue la cuarta causa con 33 509 muertes, lo que representa 11.8% del total de defunciones entre los varones. Estuvo solamente por debajo de los decesos por las enfermedades del sistema circulatorio y las enfermedades endocrinas, nutricionales y metabólicas (INEGI, 2011).

En la actualidad es posible curar y prevenir el cáncer con las estrategias multidisciplinarias de tratamiento disponibles. Esta temible enfermedad, en un tiempo sinónimo de muerte ha cedido ante los avances de la actual detección precoz y el diagnóstico, así como el mayor desarrollo de múltiples modalidades terapéuticas (Rubin, 2003). Sin embargo, se continúa en la búsqueda de agentes antitumorales más efectivos y selectivos debido a que uno de los problemas en el desarrollo de fármacos anti cáncer en la clínica es la toxicidad a largo plazo de las quimioterapias, que afectan virtualmente cada órgano del cuerpo (Chabner & Roberts Jr, 2005). De manera que una de las cuestiones en la investigación sobre



el cáncer es la búsqueda de compuestos anticáncer que puedan ser usados para regular el ciclo celular y conduzcan a tratamientos antitumorales más efectivos (Santos y cols., 2009).

En este sentido, se han reportado algunos compuestos que reconocen al ADN entre los que se encuentran los llamados “Groove binders” o acanaladores, los compuestos alquilantes y los agentes intercaladores; estos últimos son usados rutinariamente, siendo los de mayor interés en oncología clínica las antraciclinas, acridinas y antraquinonas. Estas moléculas comparten una estructura planar (aromática, policíclica) gracias a la cual se apilan entre los pares de DNA en los sitios de intercalamiento lo cual ocasiona cambios conformacionales en la doble hélice alterando la duplicación, transcripción y el reparamiento (Wu y cols., 2009).

Muchas de estas moléculas provienen de productos naturales, siendo estos una de las fuentes más importantes para el descubrimiento de productos innovadores. Existen muchos productos naturales que han mostrado interacciones con el ADN formando complejos no covalentes, además, un relativamente nuevo concepto ha sido la idea de la interferencia entre la interfase en la interacción de dos proteínas o entre proteínas y ácidos nucleídos. Una de las clases de productos naturales más exitosas en este concepto para un uso médico son los inhibidores de las topoisomerasas, enzimas que pueden alterar la topología del ADN rompiendo y uniendo las hebras (Kool, 1999).

Recientemente se han aislado y sintetizado agentes intercalantes de ADN y se ha encontrado que las β -carbolinas como la Harmina y sus derivados son altamente citotóxicos en líneas celulares tumorales, se ha demostrado una correlación entre la intercalación de ADN y la citotoxicidad y se cree que actúan a través del intercalamiento de ADN para inhibir las topoisomerasas I y II (Wu y cols., 2009). Adicionalmente, se ha informado que algunas carbolinas pueden actuar como reguladores de CDKs (Song y cols., 2002), Kinesina5 (Eg5) (Barsanti y cols., 2010) y NF- κ B (Haefner, 2002).



Es debido a estas propiedades antitumorales y a su relativamente sencilla estructura que se planteo hacer la síntesis de tetrahidro- β -carbolinas a partir del L y D-triptófano y la triptamina con diferentes sustituyentes en las posiciones 1, 2, 3 y 9, para obtener una serie de análogos que permitan determinar la relación entre la estructura y la actividad citotóxica.

En este trabajo se muestra la síntesis de 14 tetrahidro- β -carbolinas y una β -carbolina mediante la reacción de condensación de Pictet-Spengler y la relación que existe entre su estructura y la citotoxicidad en líneas celulares de cáncer humano.



3. MARCO TEÓRICO

3.1 Algunos aspectos sobre el cáncer

Se considera al cáncer como una enfermedad genética, producto de la proliferación anómala de un clon celular. La carcinogénesis se concibe como un proceso con múltiples fases, en el que se suceden una serie de alteraciones genéticas en el interior de la célula, que mediante los procesos de promoción y regresión, conducen a la malignización (Rubin, 2003).

3.1.1. Etiología

Según la actual corriente de pensamiento en oncología molecular, determinados oncogenes celulares intrínsecos, genes supresores del crecimiento y la pérdida de regulación sobre los puntos que controlan el ciclo celular, la proliferación celular y la diferenciación por medio de la expresión génica, desempeñan papeles interactivos que llevan a las células normales a un estadio premaligno que acaba por desembocar en una neoplasia manifiesta (Rubin, 2003).

En estudios sobre las vías de transducción de señal en las células, se observó que muchos aspectos del crecimiento celular normal, de su diferenciación y su muerte se controlan por medio del equilibrio entre las señales positivas y negativas que se originan en el interior y el exterior de la célula. En el cáncer este equilibrio está alterado como consecuencia de los cambios en los productos génicos implicados, cualquier alteración en su capacidad para responder a una señal específica puede hacer que una célula prolifere ante otras células que normalmente evitarían tal proliferación. Las alteraciones genéticas pueden originarse directa o indirectamente en factores como las mutaciones génicas hereditarias, la lesión del ADN secundaria a sustancias químicas o radiaciones, la incorporación de determinados virus al interior de la célula o errores aleatorios durante la síntesis del ADN. Fearon y Vogelstein presentaron un modelo de progresión tumoral que fue desarrollado para el cáncer de colon (Fig. 2) y es una buena herramienta para su mejor entendimiento, este modelo propone que la

mutación de un gen denominado APC (poliposis adenomatosa de colon) da lugar a un aumento del nivel de proliferación en una o varias células del tejido normal. La hipometilación del ADN, la activación del protooncogen *KRAS* y la pérdida del gen *DCC* (deleción en el cáncer de colon) están implicadas en la progresión del adenoma benigno. La mutación del gen supresor tumoral *TP53* y otras pérdidas cromosómicas están implicadas en la progresión del carcinoma maligno y a la metástasis (Rubin, 2003).

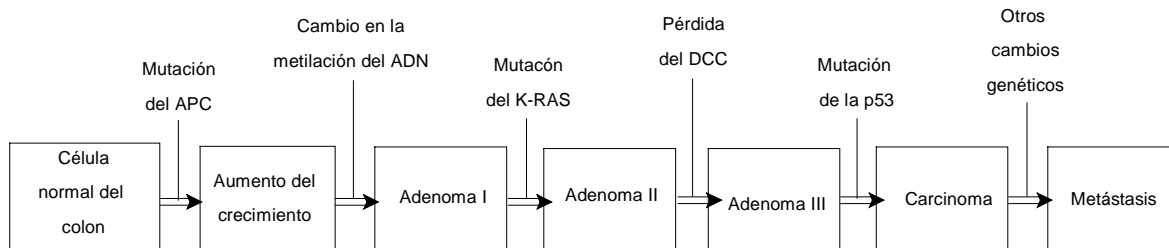


Figura 2. Modelo de los cambios genéticos y la progresión del cáncer de colon. [Modificado de Rubin, 2003]

Los datos obtenidos de los estudios epidemiológicos sugieren que la mayoría de los cánceres humanos (50%-80%) están producidos por agentes ambientales y aunque los factores genéticos intrínsecos son importantes a la hora de determinar la susceptibilidad individual, el hecho es que la mayoría de los cánceres humanos no siguen o reflejan simples patrones hereditarios, ello significa que la inmensa mayoría de los cánceres se pueden prevenir si se llegan a identificar los factores causales externos (Rubin, 2003).

Los factores externos conocidos que causan cáncer incluyen: a) carcinógenos físicos, como la luz ultravioleta y la radiación ionizante; b) carcinógenos químicos, como el asbesto y el humo del tabaco, y c) carcinógenos biológicos, como las infecciones causadas por determinados virus, bacterias o parásitos (Rubin, 2003).



3.1.2. Control del ciclo celular

El ciclo celular se regula por una serie de proteínas conocidas como ciclinas, cinasas dependientes de ciclinas (CDK cyclin dependent kinases) e inhibidores de cinasas dependientes de ciclinas (CDKI), que participan activando e inactivando las reacciones de fosforilación sobre proteínas específicas. Estas reacciones regulan las rutas bioquímicas o puntos de control de las señales inhibitorias mitogénicas y de crecimiento, y coordinan la secuencia de transiciones del ciclo celular. En la fase tardía G1 existen importantes puntos de control cuando la célula debe realizar y completar la síntesis de ADN, y en G2, donde ha de realizar y completar la mitosis. Las ciclinas actúan como reguladores positivos de la actividad de las cinasas dependientes de ciclinas, ya que esta actividad depende de su unión con la ciclina apropiada. Los CDKI actúan como reguladores negativos de esa actividad (Rubin, 2003).

Los niveles de ciclinas fluctúan durante el ciclo, alcanzándose los picos de producción en el momento de la máxima actividad de las cinasas. El estricto control de la degradación de las ciclinas en varias partes del ciclo celular también contribuye a regular la actividad de las CDK. Como se indica en la figura 3, el paso de la fase G₁ a la S se controla por las actividades de las CDK asociadas con las ciclinas D, E y A. La ciclina D y sus CDK asociadas (2, 4, 5 y 6) son responsables de la fosforilación de la proteína pRB del retinoblastoma, necesaria para la transición celular de la fase G₁ a la S. En su forma hiperfosforilada, la pRB se une al factor de transcripción E2F e inhibe la transcripción de proteínas esenciales para la entrada en la fase S. La fosforilación de la pRB libera E2F y se activa la transcripción. Tanto las CDK asociadas con la ciclina E como las asociadas con la A desempeñan un papel modulador de la actividad transcriptoras y son fundamentales para la progresión de la fase S. Los complejos ciclina D/CDK también parecen estar implicados en la reentrada de las células quiescentes (G₀) en el ciclo. La cinasa dependiente de ciclina 1 CDK1 (también denominada CDC-2) se asocia con la ciclina B y desempeña una tarea de control de la entrada de las células en mitosis (Rubin, 2003).

Existen dos familias diferentes de inhibidores de las CDK (CDKI): las KIP (proteínas inhibidoras de cinasas) y las INK4 (inhibidoras de la CDK4). La familia KIP incluye la CIP1/WAF1, también denominada p21, SDI1, la KIP1 y la KIP2. Estas proteínas unen al complejo ciclina-CDK e inhiben su actividad. Pequeñas variaciones en la concentración de KIP/CDK en las células controlan la actividad de la cinasa dependiente de la ciclina en los puntos de control del ciclo celular. El aumento de los niveles de las KIP en las células suele provocar la detención de G_1 , por lo que estas proteínas desempeñan importantes tareas en la diferenciación, la senescencia y las respuestas celulares a las citocinas reguladoras del crecimiento y al daño del ADN. En particular la p21 tiene una regulación positiva en las células en fase de senescencia o tras el daño del ADN, y actúa deteniendo a las células en G_1 o finalizando la síntesis de ADN. La familia INK4 de los CDKI incluye a la p15INK4b, p16INK4a, p18INK4c y la ciclina D-CDK4 o -CDK6 y pueden impedir que las células abandonen la fase G_1 (Rubin, 2003).

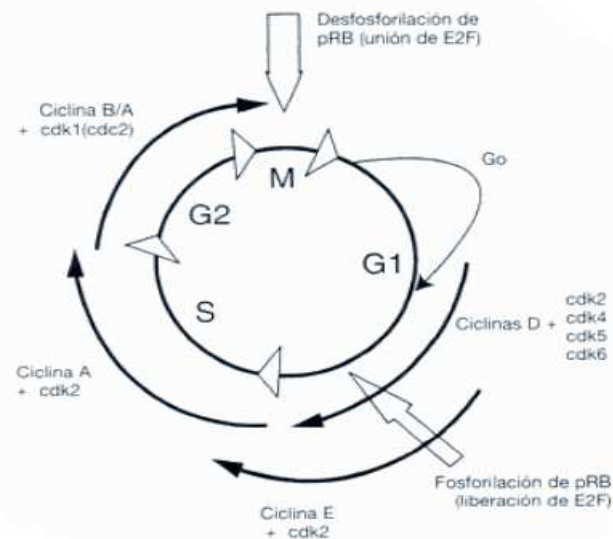


Figura 3. El ciclo celular y las ciclinas y cinasas dependientes de ciclinas (CDK) asociadas. El círculo interno representa el ciclo celular y las flechas gruesas indican donde se activan las distintas ciclinas y sus CDK asociadas. Las flechas abiertas indican el cambio en la fosforilación de la proteína del retinoblastoma (pRB). [Rubin, 2003]



Los genes que regulan el control del ciclo celular suelen estar alterados en las células cancerosas. En los tumores humanos, son habituales los cambios genéticos en la ciclina D y se ha observado una sobreexpresión de la ciclina D1 hasta en el 45% de los cánceres de mama. El gen *INK4a* es uno de los que muta con mayor frecuencia en los tumores humanos y está implicado en el melanoma familiar. También es habitual la alteración de las vías reguladoras de la actividad de la pRB (Rubin, 2003).

3.2 Productos naturales y cáncer

El papel de los productos naturales (PN) como fuente para la cura de diversas enfermedades ha sido reconocido desde tiempos antiguos. Hoy en día con el avance de la ciencia y la tecnología y el progreso de la química combinatoria, los PN siguen teniendo una enorme contribución en el descubrimiento de nuevos fármacos. Muchos compuestos derivados de plantas se han empleado satisfactoriamente para el tratamiento del cáncer, siendo de los ejemplos más significativos los alcaloides de la familia de la vinca aislados de la especie *Catharanthus roseus*, el taxol proveniente de la corteza del árbol *Taxus brevifolia* y el etoposido (epipodofilotoxina) aislado de las especies *Podophyllum peltatum* y *Podophyllum emodi* (da Rocha y cols., 2001).

Existen muchos productos naturales que han mostrado interacciones con el ADN, los cuales toman como ventaja sus propiedades de unión con él para reaccionar en alguna forma. Por ejemplo es común encontrar moléculas electrofílicas que reaccionan con sitios nucleofílicos en las bases del ADN, o radicales libres que reaccionan con la parte con desoxirribosa. Algunos mecanismos de reacción resultan en un ataque covalente del producto natural con el ADN y algunos otros nunca lo forman. Además, es posible la interferencia en la interfase de la interacción de dos proteínas o entre proteínas y ácidos nucleicos como muestran los PN inhibidores de las topoisomerasas (Kool, 1999).

Aproximadamente el 60% de los fármacos anticáncer introducidas en el 2002 fueron productos naturales o derivados de los mismos. Los PN que son biológicamente activos, de uso terapéutico y que se unen con el ADN continúan revelando nuevos paradigmas en el reconocimiento de secuencias selectivas, para definir nuevas dianas terapéuticas, para explotar nuevos mecanismos que logren la selectividad celular y para proveer una rica fuente de nuevos fármacos. Diversos estudios a lo largo del tiempo han arrojado algunos datos sobre el modo de unión y reconocimiento de algunas pequeñas moléculas con el ADN, muchas han surgido como consecuencia de definir el sitio de acción (ADN) de los productos naturales biológicamente activos y la subsecuente elucidación de su selectividad de enlace y su estructura de enlace. Actualmente se conocen modelos generales de reconocimiento; sin embargo, aun son desconocidos algunos aspectos estructurales importantes para dar la afinidad o selectividad para la interacción con el ADN (Tse & Boger, 2003).

3.2.1. Interacción de PN con el ADN

La unión de pequeñas moléculas con el ADN se puede clasificar en tres calases de interacción: intercalación, unión al surco menor del ADN y unión al surco mayor (Tse & Boger, 2003) (Fig. 4).

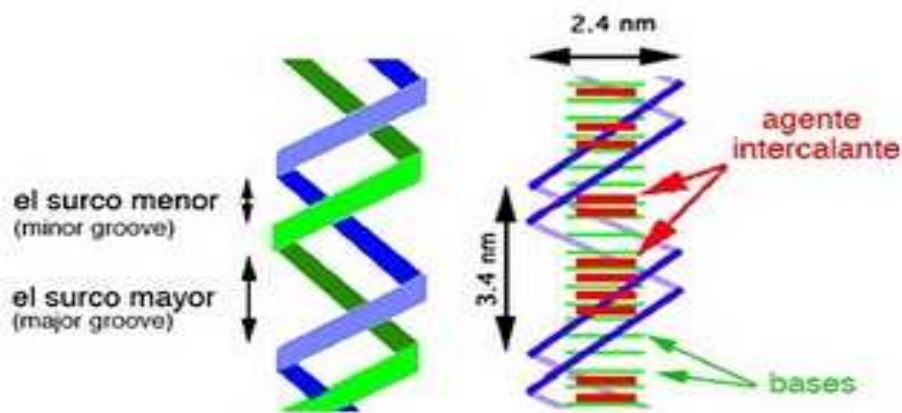


Figura 4. Sitios de interacción de pequeñas moléculas con el ADN. [Miryam, 2008]



3.2.1.1. Intercalación

Este concepto fue reconocido por primera vez en estudios de aminoacridinas realizados por Lerman en 1961. La propuesta resultó de la observación de cambios físicos en el ADN por la unión con proflavina, incluyendo cambios en los patrones de difracción de rayos X, incremento de la viscosidad y la disminución del coeficiente de sedimentación. Esta distorsión física del ADN se ha convertido en la señal de intercalación. La conexión entre la intercalación y la distorsión de la estructura natural del ADN ha provisto las bases para la correlación entre la simple intercalación y el potencial mutagénico y ha dado paso a la predilección del ADN como blanco quimioterapéutico (Tse & Boger, 2003).

Un extenso número de productos naturales que se unen al ADN lo hacen por medio de intercalación y algunos de ellos se unen al canal menor y/o mayor del ADN siendo estabilizados por la intercalación de un cromóforo de quinona. De hecho una aplicación importante del diseño *de novo* de intercaladores es su ataque análogo a la secuencia selectiva de moléculas de unión al surco o canal para aumentar su afinidad, selectividad o su estabilidad temporal (Tse & Boger, 2003).

Las características estructurales que llevan a la intercalación y la selectividad de enlace, aunque es aparentemente simple, es muy compleja y ha sido objeto de extensivos estudios. Se ha pensado que las mayores fuerzas que actúan en la intercalación son interacciones- π y las interacciones de estabilización electrostática, donde el cromóforo busca el máximo traslape con los pares de bases (intercalación paralela). El típico ejemplo es el que forma la actinomicina posicionada en el ADN para hacer el máximo traslape con los pares de bases de manera que los sustituyentes del péptido cíclico quedan en el surco menor. (Tse & Boger, 2003).

3.2.1.2. Unión al surco menor

Las pequeñas moléculas que se unen al surco menor del ADN son adiciones más recientes en este campo. A diferencia de la intercalación, donde la unión con



el compuesto induce un gran cambio en la conformación del ADN, las uniones al surco menor se caracterizan por una pequeña o no aparente distorsión en el ADN y a veces ocurre con cambios inducidos en la conformación del enlace del compuesto (Tse & Boger, 2003).

3.2.1.3. Unión al surco mayor

La unión con el surco mayor de ADN no ha sido tan explotada con pequeñas moléculas o productos naturales como el canal menor. Esto es de sorprender dado el hecho de que los surcos mayores contienen mas donadores de puentes de hidrogeno y sitios aceptores y por consecuencia mayor información; de hecho la mayoría de las proteínas tienen contacto y reconocen esta cara del ADN. No obstante, hasta la fecha solamente hay algunos pocos ejemplos de productos naturales que se unan selectivamente al surco mayor, de los cuales muchos se unen por intercalación y forman además contactos de puentes de hidrogeno con estos surcos (Tse & Boger, 2003).

3.2.2. Inhibidores de las ADN Topoisomerasas

Las Topoisomerasas son enzimas que forman parte de la maquinaria celular capaces de causar alteraciones en la topología del ADN necesarias para el buen funcionamiento de la célula. Existen dos tipos de topoisomerasas eucarióticas, topoisomerasa I y topoisomerasa II las cuales se definen de acuerdo a su mecanismo catalítico; la topoisomerasa I cataliza el paso de la cadena de ADN a través de la ruptura transitoria de una sola hebra, que incluye la relajación del ADN superenrollado teniendo una gran participación en la duplicación, transcripción y recombinación pero sin ser esencial para la sobrevivencia de la célula; por su parte, la topoisomerasa II cataliza el paso a través de la ruptura de la doble hélice, pero además ha mostrado la habilidad de remover e introducir catenanos de ADN y ser esencial para la sobrevivencia de la célula. La topoisomerasa II se ha establecido como uno de los blancos quimioterapéuticos vitales y preeminentes siendo la diana para dos de los cinco agentes antitumorales más importantes, el

etoposido y la adriamicina. Por su parte la topoisomerasa I también ha demostrado ser un buen blanco quimioterapéutico siendo inhibida por moléculas con una variada diversidad estructural, como por derivados de la camptotecina (MacDonald y cols., 1999).

La unión de pequeñas moléculas al ADN puede ser mediante intercalación o unión con el surco menor, generalmente, tal asociación puede servir para alterar la conformación del ADN e inhibir el reconocimiento de la enzima, o posiblemente promover la formación del complejo inhibidor- ADN- enzima para bloquear el acceso de la enzima a los sitios reactivos del sustrato, o haciendo rígido el ADN para restringir su alteración topológica durante la catálisis (fig. 5), (MacDonal y cols., 1999).

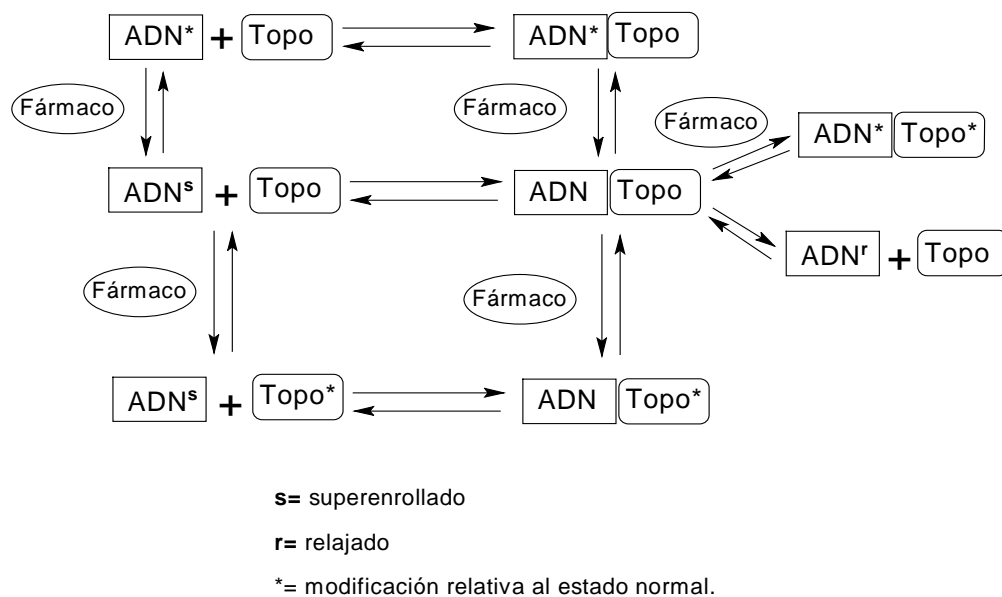


Figura 5. Inhibición de las ADN topoisomerasas. [Modificado de MacDonald y cols., 1999]

Una importancia fundamental del desarrollo de agentes dirigidos a las topoisomerasas ha sido el reconocimiento de la muerte celular inducida por estos agentes a través de la apoptosis. La señal apoptótica aparece involucrando el reconocimiento por p53 del daño al ADN causado por un agente dirigido a la topoisomerasa y que procede a través de bcl-2 (MacDonald y cols., 1999).

El descubrimiento de nuevos agentes dirigidos a las topoisomerasas y el subyacente entendimiento de los mecanismos fundamentales de los archivos clínicos de estos agentes pueden proporcionar los conocimientos necesarios para conseguir que estos agentes sean exitosos. (MacDonald y cols., 1999).

3.2.3. Acción sobre blancos específicos

Dado que los agentes que dañan al ADN tienen poca selectividad para eliminar a las células tumorales con respecto a las células proliferativas normales, se han ampliado las estrategias y se ha abierto la ventana hacia la búsqueda de moléculas que actúen sobre blancos más específicos como CDK's (Jenkins y cols., 2008) , NF- κ B (Haefner, 2002) , Kinesinas (Schmid & Birbach, 2008) y Eg5 (Sunder-Plassmann y cols., 2005).

3.3. β -Carbolinas

Los alcaloides β -carbolínicos son un grupo amplio de alcaloides indólicos naturales y sintéticos los cuales poseen una estructura común de un anillo tricíclico pirido (3,4-b) indol (Fig. 6) y presentan una gran diversidad de propiedades farmacológicas (Wu y cols., 2009 b), entre los que la Harmina, el Harmano y sus derivados han sido de gran interés debido a sus propiedades citotóxicas (Fig. 7).

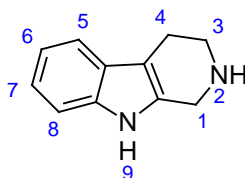


Figura 6. Esqueleto de tetrahidro- β -carbolina.

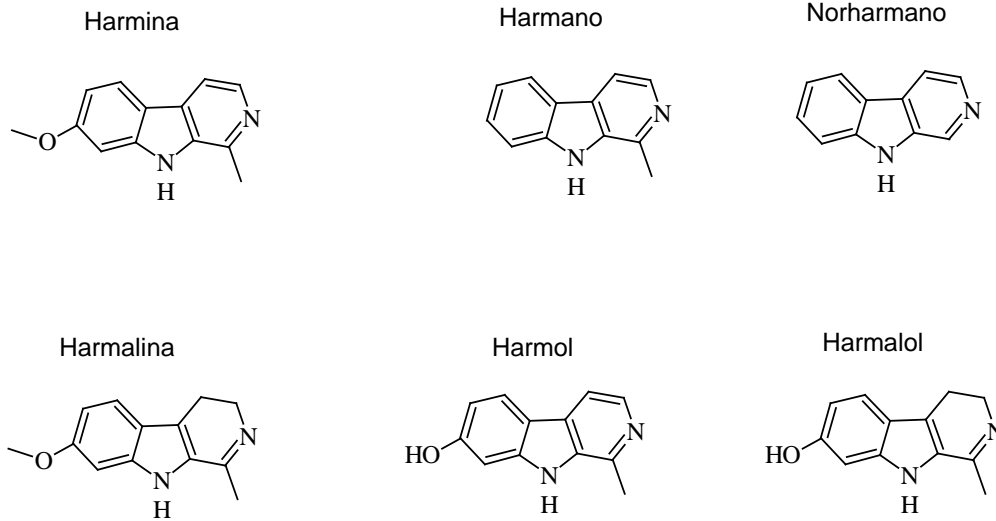


Figura 7. Estructura química de algunas dihidro-β-carbolinas y β-carbolinas naturales.

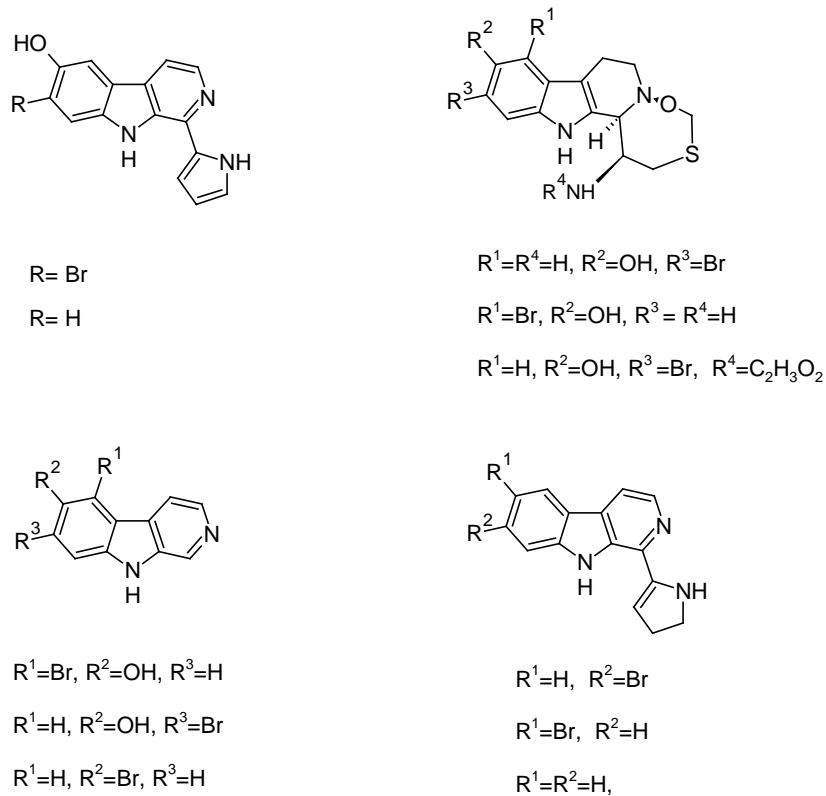


Figura 8. Estructura química de tetrahidro-β-carbolinas y β-carbolinas halogenadas

[Modificado de Kabayashi & Ishibashi, 1999].

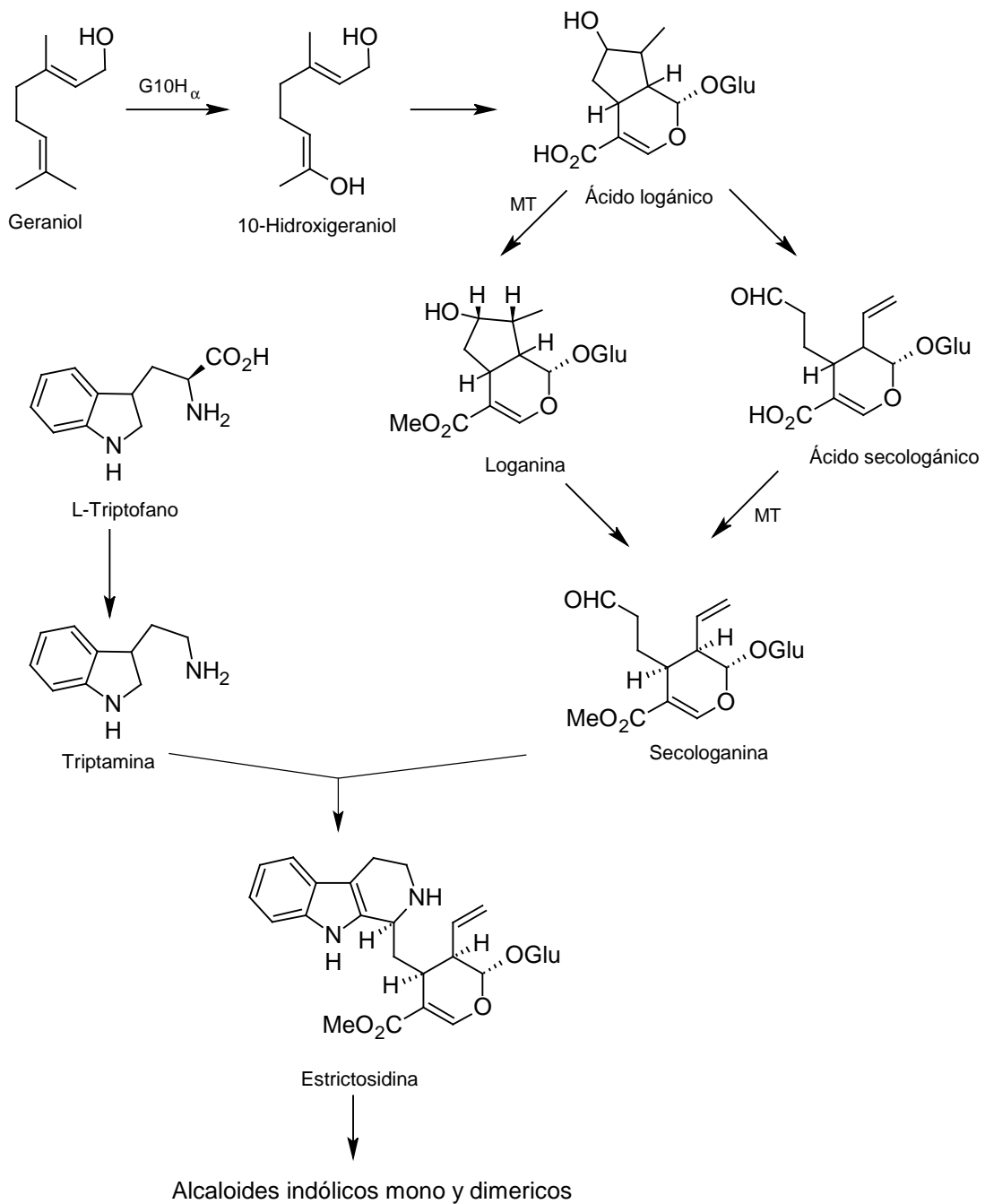


Las β -Carbolinas se han encontrado en plantas como *Passiflora edulis*, *Eleagneus angustifolia*, *Perganum harmala* (Misra y cols., 1999), *Symplocos serchuensis*, *S. racomosa Roxb* (Ishida y cols., 1999); además muchas β -carbolinas halogenadas han sido encontradas en organismos marinos, especialmente en tunicatos (ascidias o pipas de mar), incluyendo β -carbolinas simples, pirrolil- β -carbolinas, pirrolinil- β -carbolinas y tetrahidro- β -carbolinas con un anillo de oxatiazepina (Kabayashi & Ishibashi, 1999) (Fig. 8) .

3.3.1. Biosíntesis de alcaloides β -carbolínicos

Las β -carbolinas, como muchos alcaloides medicinales, son básicamente alcaloides indólicos que contienen triptamina la cual proviene del triptófano y una parte terpenoide que proviene del glucósido iridoide secologanina. La triptamina y secologanina se condensan a la forma estrictosidina, el cual es el precursor común de todos los alcaloides indólicos (Misra y cols., 1999) (Fig. 9).

La biosíntesis de los alcaloides β -carbolínicos, p. ej., el hermano del triptófano en *Passiflora edulis* y *Eleagneus angustifolia*, ha sido discutida. Se ha observado que hay una fuerte relación entre la actividad de la triptófano descarboxilasa y la síntesis de serotonina en cultivos de la raíz de *Perganum harmala*. Al adicionar triptamina a los cultivos celulares, el contenido de serotonina fue aumentando pero no el de β -carbolinas. Se hizo un intento para identificar los intermediarios de la biosíntesis de las β -carbolinas y se observó la oxidación de las dihidro- β -carbolinas a alcaloides aromáticos. Sin embargo los procesos de biosíntesis de estos compuestos no están del todo claros (Misra y cols., 1999).



MT= Metil transferasa; TDC= Triptofano descarboxilasa; G10H= Geraniol 10 Hidroxilasa.

Figura 9. Biosíntesis de alcaloides indólicos [Modificado de Misra y cols., 1999].

3.3.2. Síntesis de β -carbolinas

La síntesis de β -carbolinas generalmente se lleva a cabo mediante la reacción de Pictet-Spengler, la cual es relativamente sencilla, rápida, accesible y con buenos rendimientos en la mayoría de los casos. A continuación se muestran los principales aspectos de esta reacción.

3.3.2.1. Reacción de Pictet-Spengler

La reacción de Pictet-Spengler es uno de los métodos clave para la construcción de esqueletos de isoquinolina, un importante heterociclo encontrado en muchos productos naturales bioactivos. Esta reacción incluye la condensación de la β -ariletilamina **[1]** con un aldehído, cetona o un compuesto 1,2- dicarbonilo **[2]** para dar la correspondiente tetrahydroisoquinolina **[3]** (Li, 2005) (Fig.10).

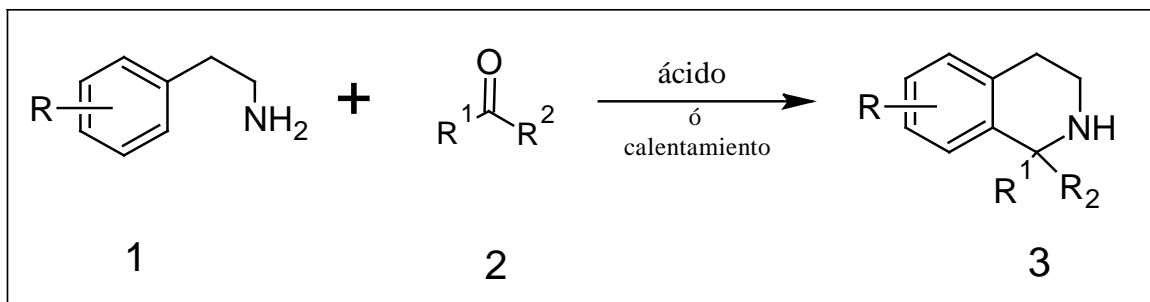


Figura 10. Pictet-Spengler Síntesis de Isoquinolinas [Modificado de. Li, 2005]

R= H, hidroxil, alcoxi, alquil ;R₁, R₂= H, alquil, Ar, carbonil

Esta reacción puede ser también un método clave para la formación de tetrahydro- β -carbolinas**[5]** a partir de bases indólicas **[4]** y aldehídos, cetonas o compuestos 1,2- dicarbonilo **[2]** (Fig.11). Estas reacciones son similarmente catalizadas con ácidos o termoinducidas y han sido utilizadas en la síntesis de numerosos alcaloides indólicos (Li, 2005).

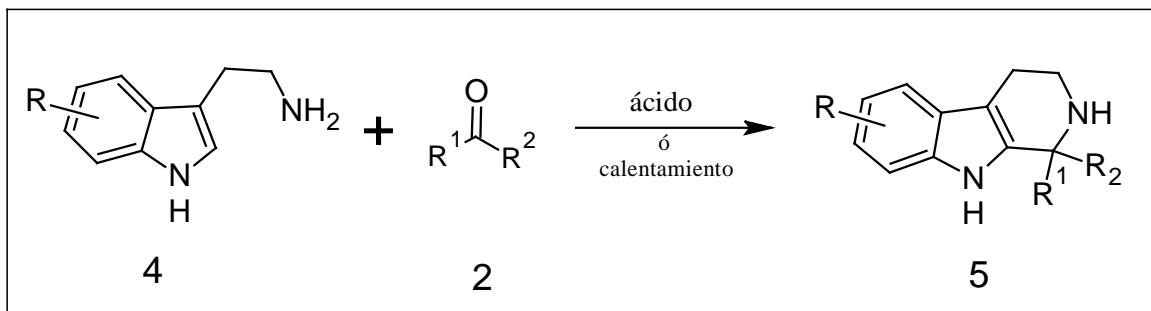


Figura 11. Pictet-Spengler Síntesis de tetrahidro-β-carbolinas [Modificado de Li, 2005]

R= H, hidroxil, alcoxi, alquil; R₁, R₂= H, alquil, Ar, carbonil

3.3.2.1.1. Características generales de la reacción

Las características generales de la reacción son las siguientes : 1) solamente las β-ariletilaminas con sustituyentes electrodonadores dan altos rendimientos; 2) el compuesto carbonílico puede ser aldehído o cetona o cualquier sustituto lábil al ácido; 3) el aldehído más frecuentemente usado es el formaldehído o su dimetil acetal; 4) el número de grupos electrodonadores en el anillo aromático tiene influencia en la facilidad de la reacción, y, por ejemplo la presencia de dos grupos alcoxi permiten que la reacción se lleve bajo condiciones fisiológicas (esto es importante en cuanto a la biosíntesis de alcaloides); 5) la reacción se lleva a cabo usualmente con un ligero exceso del compuesto carbonílico en un medio prótico o aprótico; y 6) desde que la reacción pasa por el intermediario de la base de Schiff, la base de schiff puede prepararse por separado y sometida a condiciones ácidas para que se lleve a cabo la formación de la tetrahidroisoquinolina (Kürt & Czakó, 2005).

3.3.2.1.2. Mecanismo de reacción

La reacción de Pictet-Spengler es una ciclación intramolecular, catalizada con ácido, de un intermediario imino de la 2-ariletilamina, formado por condensación con un compuesto carbonílico, para dar los derivados de 1,2,3,4-

tetrahidroisoquinolina (Kürt & Czakó, 2005). La figura 12 muestra el mecanismo de reacción en el cual el primer paso en la reacción de Pictet-Spengler es la formación de la base de Schiff. La amina y el aldehído dan lugar a un aminal, el cual es deshidratado bajo condiciones ácidas para formar la imina correspondiente. La protonación de la imina resulta en la formación del ion iminio, que reacciona con el anillo aromático rico en electrones en una ciclación 6-endo-trig para formar el heterociclo de seis miembros. La pérdida de un protón restaura la aromaticidad del ciclo, lo cual lleva a la formación del producto (Li, 2005).

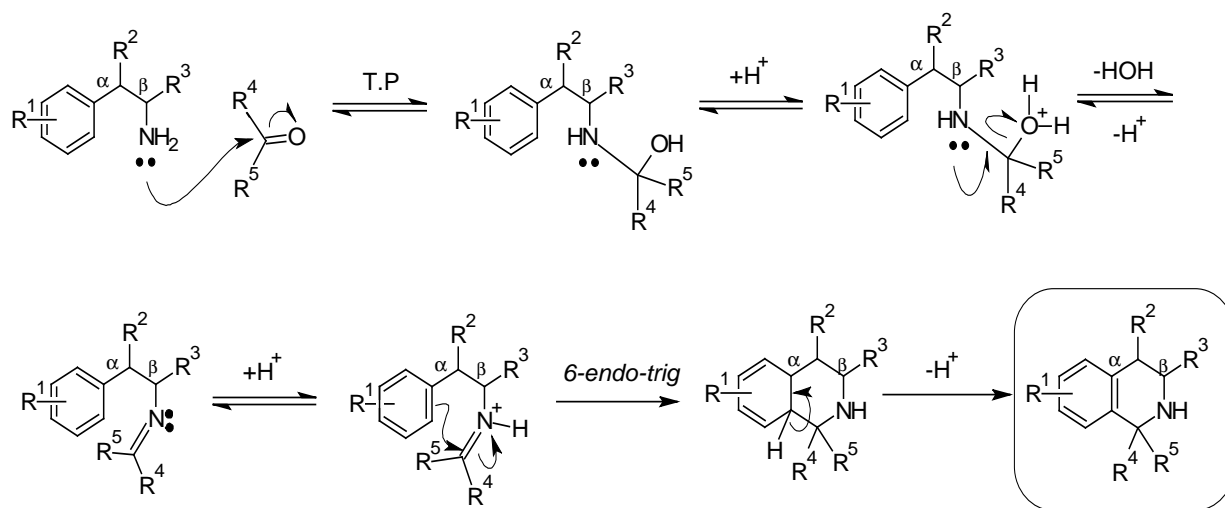


Figura 12. Pictet-Spengler. Mecanismo de reacción [Modificado de Li, 2005].

La condensación de Pictet-Spengler de bases indólicas y compuestos carbonílicos para formar las β -carbolinas es muy parecida en el mecanismo que la reacción de condensación de isoquinolinas (Li, 2005).



3.3.3. Actividad biológica de β -Carbolinas

Estos compuestos tienen una gran diversidad de efectos bioquímicos y propiedades farmacológicas. Se han reportado los efectos de estos alcaloides en el sistema nervioso central SNC, así como su afinidad con los receptores de benzodiazepinas (BZR) y 5-hidroxiserotonina; recientemente se estudia su actividad anti cancerígena y se están haciendo diseños hacia las estructuras planares (Wu y cols., 2009 b). Estudios *in vitro* han mostrado la habilidad de las β -carbolinas para retener el ciclo celular en la progresión de células tumorales (Santos y cols., 2009).

3.3.3.1. Actividad citotóxica

Se ha reportado que las β -carbolinas como la Harmina y sus derivados son altamente citotóxicos en líneas celulares tumorales y se ha demostrado una correlación entre la intercalación de ADN y la citotoxicidad. Se piensa que estos compuestos actúan a través del intercalamiento de ADN para inhibir a las topoisomerasas I y II (Wu y cols., 2009).

En el 2009 Wu y colaboradores exploraron series de conjugados N-(3-carboxil-9-benzil-b-carbolin-1-il)etilamino como potenciales agentes anticancerosos derivados de fuentes naturales, encontraron que la citotoxicidad de estos compuestos dependía de los siguientes bloques de construcción: anillo β -carbolin-3-carboxílico, aminoácido en el C-1 y bencilo en N-9, que la acción antitumoral podía estar relacionada con la sustitución en el aminoácido y que los compuestos activos *in vivo* contenían un grupo alifático pequeño (metil, isopropil), un grupo ácido (carboximetil, ac. 5-oxotetrahidropirrol-2-carboxílico y fenol) y/o un grupo básico (guanidopropil, indol) en el C-1 del aminoácido. Además, el bencilo en el nitrógeno indólico le confirió protección y un grupo perpendicular con lo cual tenía acción sobre topoisomerasas I y II. El estudio de toxicidad aguda en ratón reveló que los compuestos no presentan efectos tóxicos significativos y en comparación con lo preestablecido, no presentaron neurotoxicidad. (Wu y cols., 2009).



Por su parte Wu y colaboradores (Wu y cols., 2009 b) sintetizaron compuestos con base en la Harmina mediante la condensación de triptamina o triptófano con benzaldehído y observaron que los sustituyentes alquílicos en la posición 9 del núcleo β -carbolínico jugaban un papel importante en la actividad anticancerosa, que los sustituyentes en posición C-3 (derivados del triptófano) disminuyeron la citotoxicidad y que la actividad anticancerosa se relacionaba con una estructura planar (Wu y cols., 2009 b).

La naturaleza y las propiedades de los sustituyentes introducidos en la posición 9 del núcleo β -carbolínico pueden ser los responsables de su capacidad de inhibir a la Topo I, los grupos electrodonadores son más favorables mientras que los sustituyentes electroattractores disminuyen la inhibición de la enzima. Por otra parte, los compuestos que presentan una mayor intercalación con el ADN corresponden a los más potentes inhibidores de Topo I y agentes citotóxicos, lo cual sugiere que la unión con el ADN está correlacionada con la inhibición de la Topoisomerasa I o la citotoxicidad *in vitro*; también, en este estudio se demostró que las β -carbolinas pueden actuar como fotosensibilizadores en la ruptura del ADN (Cao y cols., 2005).

En cuanto a la inhibición de Topo II, se ha informado la síntesis de derivados aril tetrahidro- β -carbolínicos de los cuales los más potentes fueron los derivados 1-indolil- β -carbolínicos y 1-metilendioxifenil- β -carbolínicos que lograron una estimulación de la ruptura del ADN a concentraciones menores de 25 μ M. Por analogía a la podofilotoxina esperaban que la actividad sobre Topo II residiera en el enantiómero *1R* en comparación del enantiómero *1S*, sin embargo, encontraron diferencias con lo esperado. Finalmente los autores proponen a estos compuestos como estructuras prototipo mínimas para el diseño de inhibidores de Topo II (Lehnert y cols., 1994).

La interacción de los alcaloides carbolínicos con el ADN han sido investigadas por varios métodos y todos los resultados han mostrado que estos compuestos se intercalan con el ADN en diferentes grados; sin embargo, aunque se ha reportado mucho acerca de la actividad antitumoral de las β -carbolinas poco se sabe de su



interacción con la molécula de ADN por sí sola, y lo que se ha encontrado en estudios con harmina, harmano, harmalol y harmalina ha sido lo siguiente: los alcaloides β -carbolínicos interactúan con las bases vía los átomos de citosina (O2), timina (O2), guanina y adenina (N7) así como con los grupos fosfato de la columna (unión externa) con una intercalación débil y parcial en los pares de bases G-C y A-T del ADN. La unión con el ADN de estas moléculas se da en este orden harmina > harmalol > harmalina > harmano, la mayor actividad de la harmina se atribuye a la presencia de un metoxilo en el anillo bencénico del esqueleto β -carbolí. Por otra parte, la harmina es más activa que la harmalina debido a la planaridad de la primera y la falta de planaridad de la segunda, de lo cual se puede concluir que la unión de compuestos planares con el ADN es más fuerte que con compuestos no planares, con la disminución en la planaridad de los compuestos también disminuye la afinidad por el ADN. También se informó que el harmalol tiene más afinidad al ADN que la harmalina y que esto puede estar relacionado con una mayor propiedad electrodonadora por parte del OH que del OCH_3 lo cual incrementa la afinidad de unión en el anillo indólico. Por último, no se observaron cambios conformacionales del ADN debidos a la formación de complejos con las β -carbólinas (Nafisi y cols., 2010).

El entendimiento del mecanismo y los blancos celulares responsables de la actividad citotóxica de las β -carbólinas continúa en estudio ya que se ha reportado que presentan intercalación con el ADN y la inhibición de topoisomerasas; sin embargo, sus bajas actividades indican una poca probabilidad de que sean blancos para una potente inhibición del crecimiento celular, debido a esto se ha estudiado la acción de estos compuestos sobre blancos relacionados con la regulación del ciclo celular (Song y cols., 2004).

3.3.3.1.1. Acción sobre CDK's

Como ya se mencionó, las cinasas dependientes de ciclinas (CDK) juegan un papel importante en la regulación del ciclo celular (división celular, diferenciación



celular y apoptosis) y muchas evidencias muestran que están reguladas de manera anormal en los cánceres humanos en comparación con su regulación en las células normales (Song y cols., 2002).

Se ha observado que la harmina y sus derivados son inhibidores de CDK5, CDK1 (CDC2) y CDK2; se ha informado que para que presente una buena actividad la β -carbolina necesita ser totalmente aromática y que la sustitución en la posición 6 reduce su potencia. La harmina y sus derivados pueden tener potenciales aplicaciones farmacéuticas como inhibidores de CDK's ya que tanto CDC2 y CDK2 son de gran importancia en la regulación del ciclo celular siendo blancos específicos para evitar la progresión del cáncer, y CDK5 está envuelta en la patología del desarrollo del Alzheimer. En una caracterización detallada se mostro que la harmina inhibe específicamente CDK1, CDK2 y CDK5 por una inhibición competitiva por el ATP. La harmina presentó una fuerte inhibición del crecimiento de células tumorales y de la duplicación de ADN, además de ser un inhibidor específico de la proliferación celular, efectos que son una contribución de su inhibición de CDK's (Song y cols., 2004).

Por otra parte, la importancia del desarrollo de nuevos inhibidores de las CDK's puede ser ejemplificado por la reciente validación del CDK4/ciclina D1 como blanco en células de cáncer de mama MCF-7; sin embargo, debido a que la aromaticidad de las β -carbolinas representa un mayor riesgo de efectos tóxicos por su intercalación con el ADN, se ha informado la síntesis de compuestos tetrahydro- β -carbolínicos no planares como inhibidores de CDK4, teniendo que los derivados 2-bifenil-tetrahydro- β -carbolínicos exhiben una clara selectividad por la CDK4 y que los compuestos más activos presentan una inhibición a concentraciones de 9-10 μ M (Jenkins y cols., 2008).

3.3.3.1.2. Acción sobre cinesina Eg5

Eg5 (cinesina-5) es un miembro de la familia de las proteínas cinesinas, las que hidrolizan el ATP a medida que migran a lo largo de los microtubulos, juegan



un papel importante en la motilidad del cromosoma , ensamblaje/función del huso y en el transporte de vesículas y organelos. Es esencial en la mitosis y se expresa solamente en células proliferativas, la inhibición de Eg5 bloquea la separación del centrosoma de tal modo que inhibe la división celular. Algunos agentes antimitóticos para la división celular a través de efectos directos en la estabilidad de los microtubulos, mientras que la inhibición de Eg5 bloquea la mitosis evitando la formación del huso sin afectar directamente la dinámica de los microtubulos, por lo tanto es un blanco específico para la división celular y evita la neurotoxicidad de los taxanos y los alcaloides de la vinca (Barsanti y cols., 2010) .

Recientemente se informó que las tetrahydro- β -carbolinas son potentes inhibidores de Eg5 y de los estudios de la relación estructura actividad encontraron que al colocar un grupo bencilo en el C-1 se obtiene una muy buena actividad y que esta aumenta al colocar un grupo alquilo en C-6 del esqueleto tetrahydro- β -carbólico debido a que se forma un fuerte puente de hidrogeno entre el alcohol fenolico y el carbonilo de Glu118 de la enzima, otros puentes de hidrogeno que se pudieran formar son con el NH de la carbolina; sin embargo, los resultados sugieren que la mayoría de las interacciones presentadas son hidrofóbicas. Además, durante experimentos de cocrystalización se observó que la enzima muestra selectividad por el enantiómero *R* (Barsanti y cols., 2010).

En otro estudio en el cual sintetizaron tetrahydro- β -carbolinas a partir del triptófano sustituidas también con un anillo bencénico en el C-1, encontraron que la actividad de estos compuestos dependía en gran medida de los sustituyentes en las posición 3 y 4 de este anillo y al igual que en el estudio anterior vieron que el grupo metahidroxifenil es de suma importancia para la actividad, además, observaron que los isómeros *trans* son más activos que los isómeros *cis*. Por los resultados obtenidos sugieren a las tetrahydro- β -carbolinas como candidatos potenciales para fármacos anti cáncer (Sunder-Plassmann y cols., 2005).



3.3.3.1.3. Acción sobre NF- κ B

El factor nuclear- κ B (NF- κ B) juega un papel importante en la transducción de señales y en la expresión de citocinas pro inflamatoria como el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α). Recientemente se ha visto que no solo es importante en el tratamiento de la inflamación si no también en la terapia contra el cáncer. Esto no es de sorprender ya que se ha visto que condiciones de inflamación crónica predisponen al cáncer, se han visto leucocitos asociados a tumores que liberan citocinas pro inflamatorias como TNF- α , interleucina-1 (IL-1) e interleucina-6 (IL-6) las cuales contribuyen a la progresión de la malignización. Se piensa que cuando se produce TNF- α de manera crónica esto contribuye en el crecimiento del tumor y la metástasis, además se ha reportado que el NF- κ B controla el crecimiento celular aumentando la transcripción de ciclina D1, de manera que promueve el tumor génesis mediante la supresión de la apoptosis y la estimulación de la proliferación celular. De manera que se considera atractiva la búsqueda de compuestos que puedan intervenir en la liberación de NF- κ B como los inhibidores de cinasa I κ B (IKK) (Haefner, 2002).

La función de las IKK (IKK β) es activar al NF- κ B mediante la fosforilación de su inhibidor (I κ B). Se ha reportado que las β -carbolinas pueden inhibir la IKK β actuando como antagonistas competitivos de ATP y que particularmente la β -carbolina PS-1145 desarrollada por Aventis y Millennium Pharmaceuticals demostró ser efectiva en apoptosis en ratón (Schmid & Birbach, 2008).

3.3.3.2. *Actividad genotóxica*

En una revisión sobre el posible potencial genotóxico que presentan las β -carbolinas naturales: harmano (H), norharmano (NH), harmina, harmalina, harmol y harmalol realizado por C. de Meester en 1995 se mostró que el harmano y el norharmano así como algunos de sus derivados poseen propiedades que les permiten interferir con varias enzimas y procesos bioquímicos (Meester, 1995).



Así se encontraron evidencias de que estos compuestos pueden disminuir la capacidad para reparar el daño al ADN y de arreglar mutaciones, intercalarse en las cadenas de ADN incrementando la actividad de los mutagenos, distorsionar el ADN de manera que los mutagenos puedan actuar más fácilmente, unirse a enzimas como la MAO (monoaminoxidasa) o al ion Fe de P-450 el cual modula la actividad de enzimas del sistema metabólico, formar metabolitos mutagénicos del H y NH solo en presencia de mutágenos que contengan aminas aromáticas, inactivar mutágenos directamente por medio de reacciones químicas sin la intervención de procesos metabólicos ó formar un metabolito del NH que pudiera reaccionar con el metabolito de un compuesto como el 3-aminopiridina para formar nuevas especies mutagénicas. Sin embargo en esta revisión no reportaron estudios *in vivo* de estos compuestos y más precisamente su interferencia con la iniciación o la progresión de la carcinogénesis (Meester, 1995).

En estudios posteriores se reporta que la actividad comutagénica de H y NH es considerada muy débil. También se informó que las β -carbolinas aromáticas como el harmano y la harmina son capaces de interactuar con el ADN por medio de intercalación, cosa que no sucede con las dihidro- β -carbolinas, como la harmalina. Aparentemente como ya se ha mencionado anteriormente esto se debe a la no planaridad del sistema de anillos y a la falta de aromaticidad de estas dihidro- β -carbolinas. De tal manera que las actividades que se reportan deberían de estar relacionadas con la capacidad de interactuar con el ADN, y de hecho encontraron que las β -carbolinas aromáticas fueron mas citotóxicas que las dihidro- β -carbolinas y adicionalmente se vio que el harmano, la harmina y el harmol, que están totalmente aromatizados mostraron una muy baja o casi nula actividad genotóxica, mientras la harmalina y el harmalol fueron prácticamente no genotoxicos. Otra cosa interesante que reportan es que aunque la harmina y el harmano presentaron las actividades más altas en las pruebas *in vitro*, las pruebas indican que no producen mutagenicidad *in vivo*. De manera que se sugiere que las β -carbolinas probablemente no conllevan a un riesgo genético a largo plazo (Picada y cols., 1997). Además, se han hecho más estudios y no han demostrado que dichos efectos tóxicos sean significativos (Jiménez y cols., 2008).

3.3.3.3. *Actividad en el SNC*

Las tetrahidro- β -carbolinas y las β -carbolinas totalmente aromáticas (norharmano) no sustituidas pueden cruzar la barrera hematoencefalica fácilmente, estos compuestos se han encontrado en el cerebro, el fluido cerebroespinal y en el plasma. En el cerebro el norharmano es transformado en el ion 2-metil- β -carbolinio y subsecuentemente en el ion 2,9-dimetil- β -carbolinio cuya estructura química puede ser superpuesta en el ion 1-metil-4-fenil-piridinio (MPP⁺) el cual produce el síndrome de Parkinson en humanos (fig. 12) (Hamann y cols., 2008).

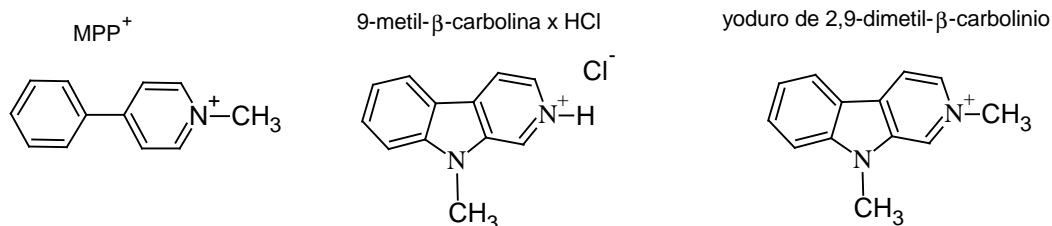


Figura 13. Estructuras químicas de MPP⁺, 9-metil- β -carbolina x HCl y yoduro de 2,9-dimetil- β -carbolinio [Modificado de Hamann y cols., 2008].

Estos compuestos fueron identificados predominantemente como agentes con acciones neurotóxicas, están presentes en cantidades significativamente altas en pacientes con Parkinson y son considerados como potenciales factores patogénicos en esta enfermedad (Hamann y cols., 2008).

Por otra parte, recientemente se ha informado que la 9-metil- β -carbolina (Fig.13) presenta efectos neuroprotectivos y actúa en la diferenciación de neuronas. Se encontraron dos acciones de este compuesto, la primera fue que es capaz de incrementar el número de neuronas dopaminérgicas (DA) en un cultivo primario mencefálico mediante la regulación positiva de la transcripción de DA /



factores neurotróficos y marcadores DA y la segunda, ejerciendo efectos neuroprotectivos en el cultivo en general, además, dicho compuesto inhibió la proliferación en células de retinoblastoma ($50\mu\text{M}$) *in vitro*. Estos hallazgos podrían tener consecuencias potenciales en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson y ayudar a generar un alto número de neuronas DA trasplantables en cultivos de células madre. (Hamann y cols., 2008).



4. HIPÓTESIS

Si las β -carbolinas presentan actividad citotóxica a líneas celulares de cáncer humano, entonces, ésta será dependiente de la naturaleza y posición de los sustituyentes en su estructura e independiente del grado de aromaticidad del tercer anillo.



5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

Sintetizar a partir del D-triptófano y L-triptófano; así como de la triptamina, tetrahidro- β -carbolinas y β -carbolinas con distintos grados de sustitución en posiciones 1, 2,3 y 9, que sean citotóxicas a líneas celulares de cáncer humano

5.2. Objetivos particulares

Obtener mediante la reacción de Pictet-Spengler de la triptamina con un aldehído o cetona adecuado, tetrahidro- β -carbolinas y β -carbolinas con diferentes grados de sustitución.

Sintetizar mediante la reacción de Pictet-Spengler empleando como sustrato el D y L-triptófano, tetrahidro- β -carbolinas con dos estereocentros en C-1 y C-3 con diferente patrón de sustitución.

Evaluar la actividad citotóxica de los compuestos obtenidos en las líneas celulares de cáncer humano.

Establecer la relación estructura-actividad cualitativa y preliminar a partir de la información obtenida.



6. METODOLOGÍA

6.1 Aspectos generales

Los aminoácidos L-Triptófano (Sigma-Aldrich, TO254-25G) y D-Triptófano (Sigma-Aldrich, T9753-5G) así como la triptamina (Sigma-Aldrich, 246557-25G) y la (1S,2S)-*N*-Tosil-1-2-difeniletildiamina (Sigma-Aldrich, 364002-500MG) utilizados en la síntesis de los compuestos, se adquirieron de forma comercial y se utilizaron directamente sin purificar. El punto de fusión de los compuestos fue determinado en un aparato Fisher-Johns. La pureza de los intermediarios y los compuestos evaluados fue determinada mediante CCF (Alugram Merck 60F₂₅₄). La espectroscopia RMN¹H (300 y 400 MHz) y RMN¹³C (75 y 100 MHz) se determinó en los equipos Varian VXR-300S y Bruker (400) en CDCl₃ y DMSO-*d*₆ con TMS como estándar interno. El espectro de infrarrojo IR (FT-IR) se determinó en un aparato Bruker, modelo *Tensor 27*. La espectroscopia de masas (IE, 70 eV) fue determinada en el aparato Jeol modelo *AX505-HA*. El exceso enantiomérico de los productos e intermediarios racémicos se determinó mediante HPLC (*HP*, Serie 1100).

Derivados de Triptamina

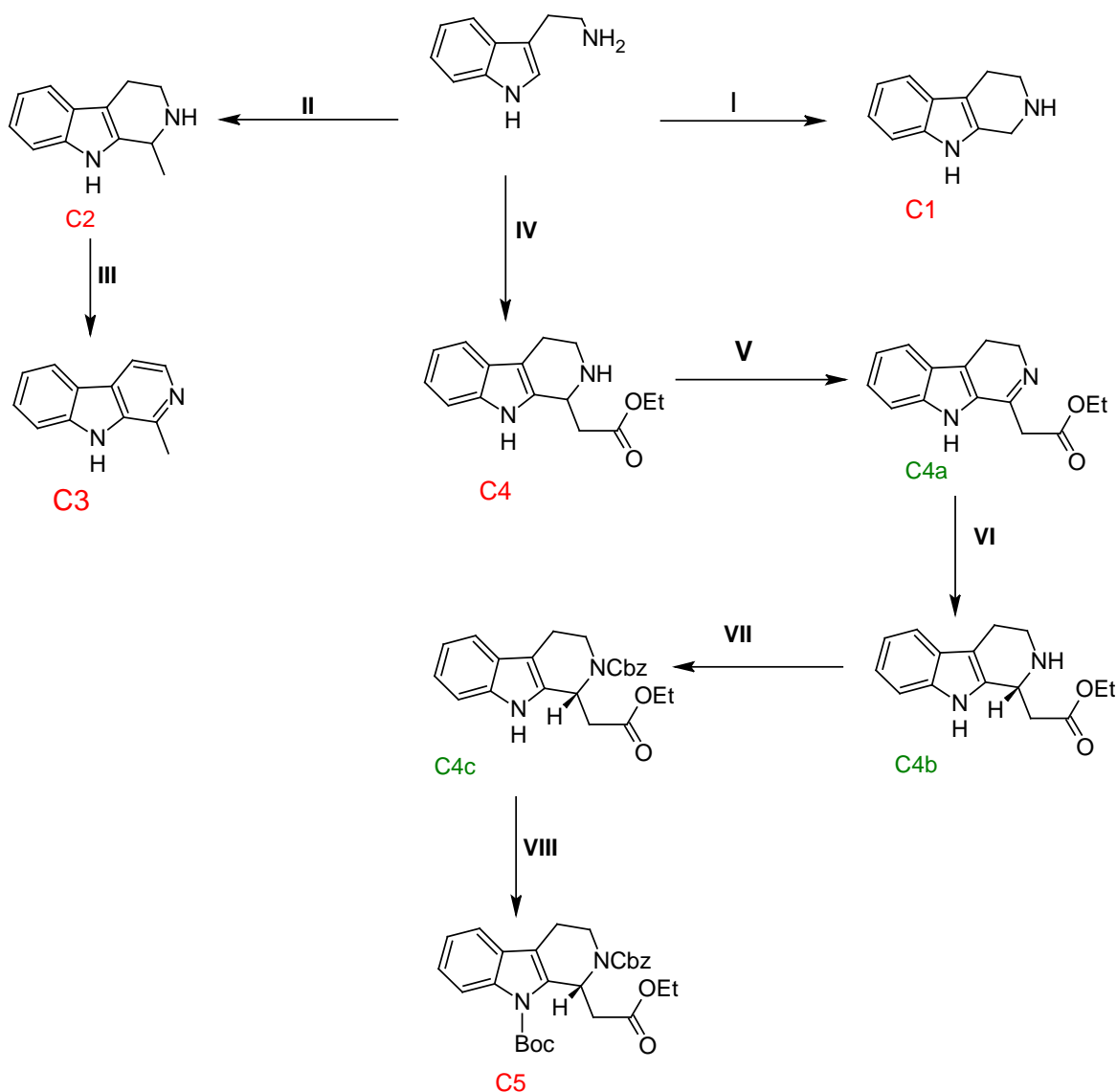


Figura 14. Esquema general de reacciones. Derivados de Triptamina

I) HCHO, EtOH, @, Δ, 6h; HCHO ó H₂SO₄, T.A, @, 24h II) ác. Pirúvico, EtOH, @, Δ, 2.5h III) KMnO₄, THF, @, 0°C, 7h IV) ác. Carboxipirúvico, EtOH, @, Δ, 34h V) KMnO₄, THF, @, -10°C → 0°C, 3h VI) HCO₂H, NEt₃, dicloro (η⁶-bencen) rutenio, (1S,2S)-N-tosil-1,2-difeniletildiamina, @ 0°C → T.A 17h VII) CbzCl, NEt₃, CH₂Cl₂, @ 0°C → T.A 17h VIII) Boc, CH₃CN, DMAP, @, T.A, 12h

Derivados de Triptófano

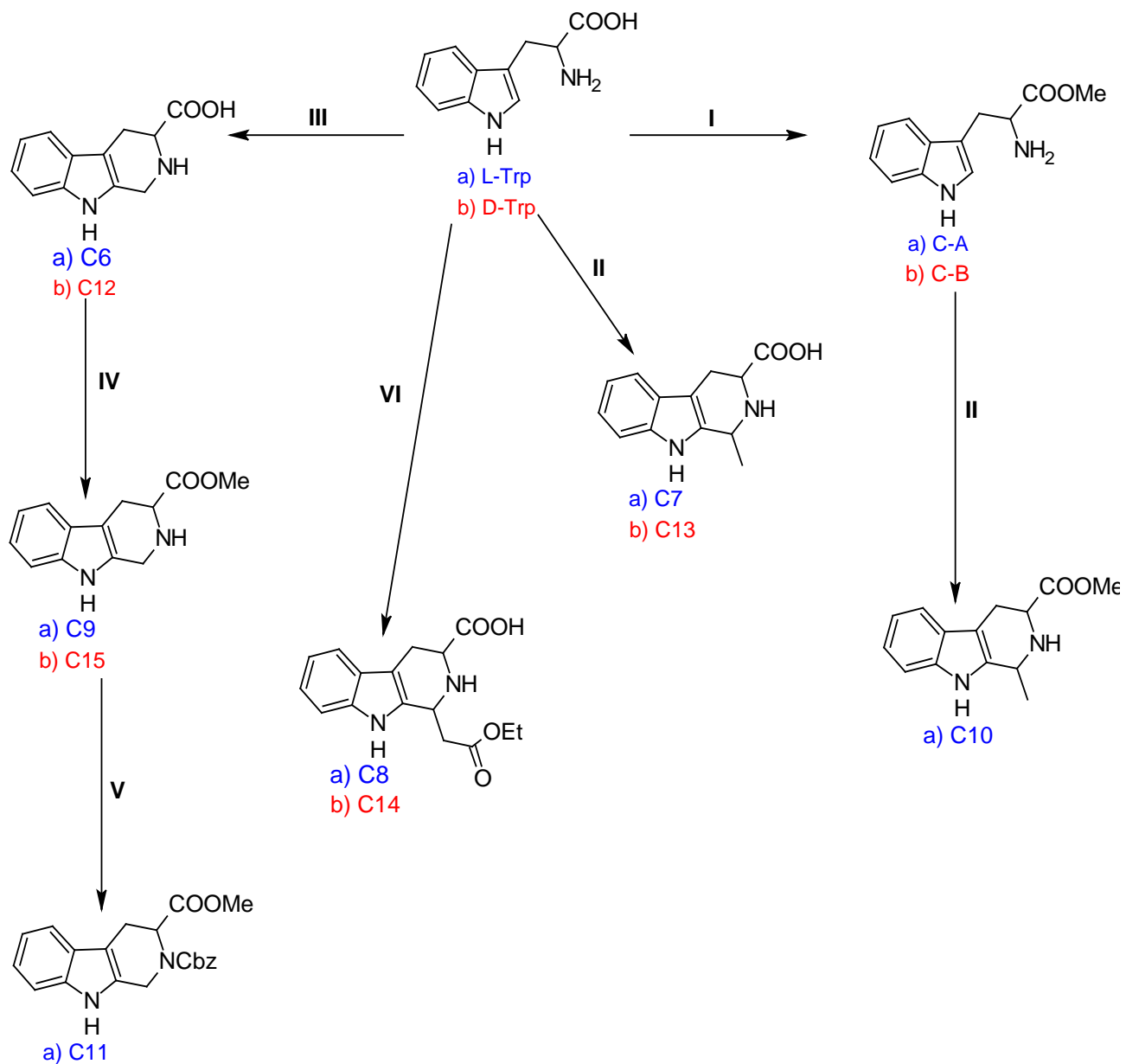


Figura 15. Esquema general de reacciones. Derivados de Triptófano

I) SOCl_2 , MeOH, @, Δ 3h II) ác. Pirúvico, H^+ , @, T.A, 72h III) HCHO, H^+ , @, T.A, 2.5h IV) AcOCl, MeOH, @, Δ 3h ó SOCl_2 , MeOH, @, Δ 3h V) CbzCl, NEt_3 , DMAP, 0°C , @, 20h VI) ác. Carboxipirúvico, H^+ , @, T.A, 72h

6.2 Síntesis

6.2.1. Síntesis del dímero de dicloro (η^6 -bencen) rutenio.

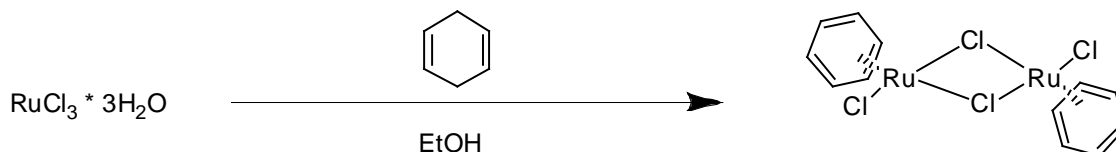


Figura 16. Síntesis del dímero de dicloro (η^6 -bencen) rutenio.

En un matraz provisto de refrigerante se colocaron 640 mg de cloruro de rutenio ($\text{RuCl}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$), 3.5ml (5ml / g $\text{RuCl}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) de 1,4-ciclohexadieno y 14ml de EtOH, la mezcla se dejo a reflujo durante 6h. Posteriormente la mezcla se filtró en presencia de atmosfera inerte y se obtuvo el producto (70%) como un sólido café-naranja el cual se colocó en una cámara de vacío para ser utilizado en la reacción correspondiente.

6.2.2. Síntesis del ácido carboxipirúvico.

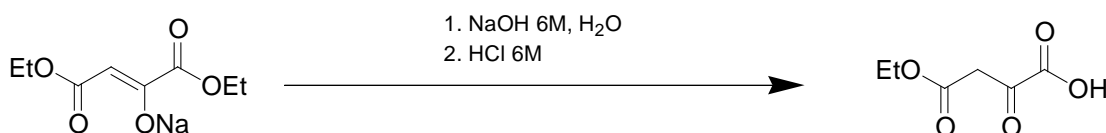


Figura 17. Síntesis del ácido carboxipirúvico.

En un matraz provisto de agitador magnético se colocaron 14.25 g de la sal de sodio del dietiloxoacetato y se disolvieron en 136 ml de agua destilada (2 ml/mmol); posteriormente se adicionaron 11.32 ml (0.167 ml/mmol sustancia) de una solución 6M de NaOH gota a gota a temperatura ambiente. La reacción se agitó por 4h a temperatura ambiente y luego se enfrió a $\sim 0^\circ\text{C}$ para adicionar 23.8

ml (0.35 ml/mmol sustancia) de HCl 6M obteniendo el producto en solución ácida. La mezcla de reacción fue extraída 12 veces con AcOEt (70 ml x 12), la fase orgánica se secó con Na₂SO₄ anhidro y se concentró a presión reducida para dar una suspensión oleosa de color amarillo que posteriormente se utilizó como sintón para reacciones posteriores.

Rendimiento: 98.6%; **RMN ¹H** (300MHz, CDCl₃): δ(ppm)= 11.6 (sa, 1H, OH) , 10.2 (sa, 1H, OH), 6.1 (s, 1H, CH), 4.3 (q, 2H, CH₂), 1.3 (t, 3H, CH₃); **RMN ¹³C** (75 MHz, CDCl₃): δ(ppm)= 171.6 (Cq), 165.7 (Cq), 157.7 (Cq), 98.5 (CH), 61.6 (CH₂), 14 (CH₃); **IR** [CHCl₃, cm⁻¹]: 3577, 3000, 1734, 1660, 1242, 1195.

6.2.3. Compuesto C-A. Síntesis del éster metílico del L-Triptófano.

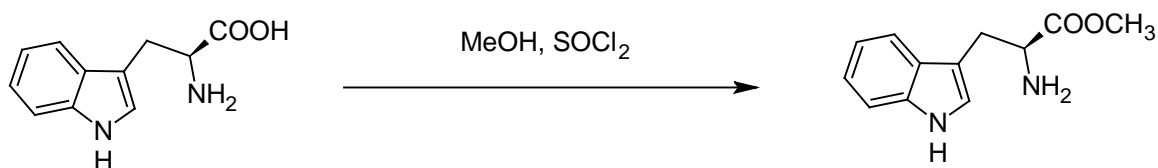


Figura 18. Síntesis del éster metílico del L-Triptófano.

En un matraz de tres bocas provisto de refrigerante y embudo de adición, bajo atmosfera inerte se colocaron 500mg de L-Triptófano (L-Trp) y se disolvieron en MeOH anhidro (Cbp), la mezcla se colocó en agitación a 0°C durante aproximadamente 10min. Posteriormente se agregaron poco a poco mediante embudo de adición ~ 2ml de cloruro de tionilo (SOCl₂). La mezcla de reacción continuó en agitación, se llevó a temperatura ambiente y a reflujo (90°C) donde permaneció durante 3hr. Posteriormente, el contenido del matraz se trató con solución saturada de bicarbonato de sodio, se extrajo con DCM y la fracción orgánica se concentró a presión reducida. Se recristalizó mediante par de disolventes (MeOH Δ/Hex) para purificar y se obtuvo un sólido blanco fino en forma cuantitativa.

Rendimiento: 100%; **p.f.:** 195-197; **RMN ^1H** (300MHz, DMSO- d_6): δ (ppm)= 11.1 (s, 1H, NH), 8.7 (s, 2H, NH_2), 7.5 (d, $J=7.8$ Hz, 1H, CH), 7.3 (d, $J=7.8$ Hz, 1H, CH), 7.2 (s, 1H, CH), 7.1 (t, 1H, CH), 7.0 (t, 1H, CH), 4.2 (t, 1H, CH), 3.6 (s, 3H, OCH_3); **RMN ^{13}C** (75 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm)= 170 (C=O), 136.2 (Cq), 126.8 (Cq), 126.8 (CH), 125 (CH), 121 (CH), 119 (CH), 118 (CH), 111.5 (CH), 106.3 (Cq), 52.6 (CH), 52.5 (OCH_3), 26 (CH_2); **EM-IE** (m/z, %): 219 [M^{+} , 7], 218 [$\text{M}^{+}-1,15$], 159 [13], 130 [100]; **IR** [KBr, cm^{-1}]: 3266, 2950, 1749, 1580, 1500, 1439, 1387, 1355, 1285, 1234.

6.2.4. Compuesto C-B. Síntesis del éster metílico del D-Triptófano.

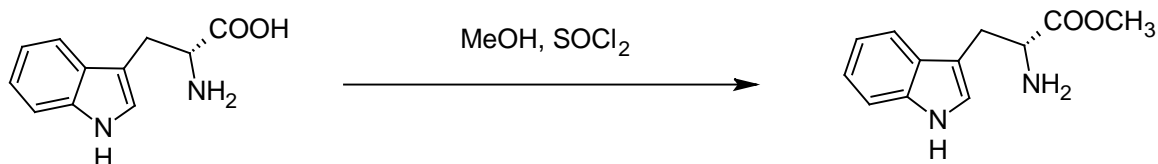


Figura 19. Síntesis del éster metílico del D-Triptófano.

En un matraz de tres bocas provisto de refrigerante y embudo de adición, bajo atmosfera inerte se colocaron 500mg de D-Triptófano (D-Trp) y se disolvieron con MeOH anhidro (Cbp), la mezcla se colocó en agitación a 0 °C durante aproximadamente 10min. Posteriormente se agregaron poco a poco mediante embudo de adición ~ 2ml de cloruro de tionilo (SOCl_2). La mezcla de reacción continuó en agitación, se llevó a temperatura ambiente y a reflujo (90°C) donde permaneció durante 3hr. Posteriormente el contenido del matraz se trató con solución saturada de bicarbonato de sodio, se extrajo con DCM y la fracción orgánica se concentró a presión reducida. Se hizo una recristalización con par de disolventes (MeOH Δ /Hex) para purificar y se obtuvo un sólido blanco fino en forma cuantitativa.

Los espectros de IR, EM y RMN ^1H y ^{13}C concuerdan con los informados previamente para su enantiómero (6.2.3).

6.2.5. Compuesto C1. Síntesis de la 1,2,3,4-tetrahidro- β -carbolina.

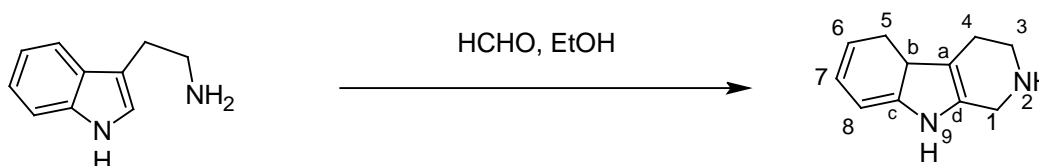


Figura 20. Síntesis del compuesto C1.

En un matraz de dos bocas provisto de refrigerante con pipa y embudo de adición, se colocaron 970 mg del clorhidrato de triptamina disuelta en 16ml (3.2ml /mmol) de etanol absoluto. La solución mantenida en atmosfera inerte se calentó a reflujo (70°C-100°C) y en estas condiciones se adicio gota a gota el formol (2ml). Se mantuvo el reflujo por aproximadamente 6h. Una vez transcurrido este tiempo el contenido del matraz se precipitó por par de disolventes (CH_2Cl_2 / Hex) y se filtro el precipitado formado. Se obtuvo un sólido muy fino de color blanco-amarillento.

Rendimiento: 10%; **p.f.:**240-242; **RMN ^1H** (300MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ (ppm)= 11.06 (s,1H, H-9, indol NH) , 9.5 (sa, 1H, NH), 7.45 (d, $J= 7.8$ Hz , 1H, H_{ar} -8), 7.34 (d, $J= 7.8$ Hz, 1H, H_{ar} -5), 7.17-6.975 (2 x t, , $J= 7.2, 7.8, 7.8, 7.2$ Hz, 2H, H_{ar} -6, H_{ar} -7), 4.32 (s, 2H, H-1, CH_2), 3.35 (m, 2H, H-3, CH_2), 2.92 (t, $J= 5.7, 6$ Hz, 2H, H-4, CH_2); **RMN ^{13}C** (75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ (ppm)= 136.03 (Cq), 126.59 (Cq), 125.94 (Cq), 121.55 (CH), 118.91 (CH), 117.81 (CH), 111.30 (CH), 105.46 (Cq), 41.40 ($\underline{\text{CH}_2}$), 40.19 ($\underline{\text{CH}_2}$), 18.04 ($\underline{\text{CH}_2}$) ; **EM-IE** (m/z, %): 172 [M^+ , 35], 143 [100] ; **UV** (λ_{max} en MeOH) nm: 221.

6.2.6. Compuesto C2. Síntesis de (*rac*) 1-metil-1,2,3,4-tetrahidro- β -carbolina.

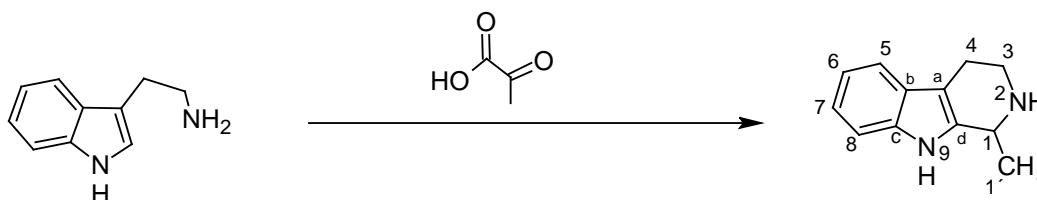


Figura 21. Síntesis del compuesto C2.

En un matraz de dos bocas provisto de refrigerante y embudo de adición se colocaron 3.65g del clorhidrato de triptamina disuelta en 59.4ml (3.2ml /mmol) de etanol absoluto. La solución mantenida en atmosfera inerte se calentó a reflujo y en estas condiciones se adicionaron, gota a gota, 1.6ml de ácido pirúvico disueltos en 44.4ml de etanol (2ml/mmol). La reacción se mantuvo en reflujo durante 2.5 h, después de las cuales se puso en refrigeración. Posteriormente se tomó una alícuota de 1g y se trató con una solución saturada de bicarbonato de sodio (~30ml); se observó la presencia de un precipitado coloidal el cual se extrajo con acetato de etilo (30ml x 3). La fase orgánica se trató con una solución saturada de cloruro de sodio y después se secó con sulfato de sodio anhidro, se filtró y se concentró a presión reducida. Se formó un precipitado que fue lavado con hexano y éter isopropílico que después se filtró para obtener un sólido de color café claro.

Rendimiento: 25%; **p.f.:** 158-161; **RMN ^1H** (300MHz, CDCl_3): δ (ppm)= 8.00 (s, 1H, H-9, indol NH), 7.46 (d, $J=7.9$ Hz, 1H, H_{ar} -8), 7.28 (d, $J=7.2$ Hz, 1H, H_{ar} -5), 7.16-7.06 (m, 2H, 6- H_{ar} , 7- H_{ar}), 4.17 (m, 1H, H-1, CH_2), 3.4 (m, 1H), 3.05 (m, 1H), 2.73 (m), 1.43 (d, 3H, H-1', CH_3); **RMN ^{13}C** (75 MHz, CDCl_3): δ (ppm)= 136.68 (Cq), 135.68 (Cq), 127.44 (Cq), 121.53 (CH), 119.38 (CH), 118.08 (CH), 110.75 (CH), 108.29 (Cq), 48.20 (CH), 42.50 (CH_2), 22.45 (CH_2), 20.55 (CH_3 , C-1'); **IR** [CHCl_3 , cm^{-1}]: 3473.50 (N-H, indol), 3005-2849 (C-H), 1455, 1377, 1306, 1241. **UV** (λ_{max} en CHCl_3) nm : 281, 244.

6.2.7. Compuesto C3. Síntesis de la 1-metil- β -carbolina.

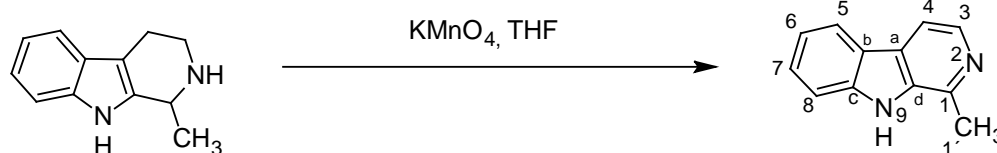


Figura 22. Síntesis del compuesto C3.

En un matraz de dos bocas provisto con un embudo de adición que contenía 650 mg de permanganato de potasio, se colocaron 161.5 mg de C2 y 16.2 ml de THF como disolvente, la mezcla se puso en agitación a una temperatura de $\sim -10^\circ$ C. Una vez que se disolvió el sólido, se agregó una pequeña cantidad de permanganato de potasio manteniendo la agitación y la temperatura constante. Aproximadamente cada 15 minutos se adicionaron pequeñas cantidades de permanganato de potasio monitoreando la reacción mediante CCF y manteniendo la agitación y la temperatura en un rango de -7° C a 0° C. La reacción se detuvo después de siete horas, el contenido del matraz se filtró y el sólido se lavó con THF frío, el filtrado se concentró a presión reducida y el sólido resultante se disolvió en DCM para dejar secar al vacío durante la noche.

Rendimiento: 16%; **p.f.:** 195-200; **RMN ^1H** (300MHz, DMSO- d_6): δ (ppm)= 13.18 (s, 1H, H-9, indol NH), 8.58 (d, $J=6$ Hz, 1H, 3-H), 8.46 (d, $J=7.8$ Hz, 1H, H_{ar} -8), 8.39 (d, $J=6$ Hz, 1H, H-4), 7.79-7.38 (m, 3H, H_{ar} -5, H_{ar} -6, H_{ar} -7), 3.09 (s, 3H, H_3 -1', CH_3); **RMN ^{13}C** (75 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm)= 143.17 (Cq), 138.71 (Cq), 133.86 (Cq), 131.54 (Cq), 131.11 (CH), 128.19 (CH), 123.33 (CH), 121.13 (CH), 119.76 (Cq), 115.27 (CH), 112.75 (CH), 15.89 (CH_3 , C-1'); **EM-IE** (m/z, %): 182 [M^+ , 100], 154 [$\text{M}-\text{C}_2\text{H}_4$, 10], 28 [$\text{M}-\text{C}_{10}\text{H}_6\text{N}_2$, 23]; **IR** [CHCl_3 , cm^{-1}]: 3354.68 (N-H, indol), 3083.31, 2751.55, 1633.83, 755.67, 479.35; **UV** (λ_{max} en MeOH) nm: 248.5.

6.2.8. Compuesto C4. Síntesis de (*rac*) 1-(2-etoxi-2-oxoetil)-1,2,3,4-tetrahidro- β -carbolina.

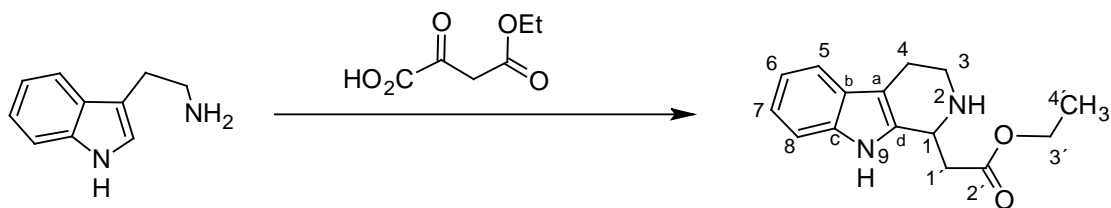


Figura 23. Síntesis del compuesto C4.

En un matraz de tres bocas provisto de refrigerante y embudo de adición se colocaron 10.2g de clorhidrato de triptamina en 165.5 ml de etanol (3.2ml/mmol), la mezcla se agitó y calentó a reflujo. Posteriormente, en aproximadamente 20min se llevó a cabo la adición gota a gota de 10g (1.2eq) de ácido carboxipirúvico disuelto en 124ml de etanol (2ml/mmol). Después de 36h, se suspendió el reflujo y se dejó a temperatura ambiente, y se llevó a refrigeración por 2 días. El precipitado se filtró para obtener un polvo beige que correspondió al clorhidrato del producto deseado.

Dicha sal se trató con una solución saturada de NaHCO_3 por una hora. La extracción orgánica convencional de la fase acuosa permitió obtener el producto (racemato) como un semisólido color café claro.

Rendimiento: 53%; **p.f.:(+HCl)**199-203; **RMN ^1H** (300MHz, CDCl_3): δ (ppm)= 8.61 (s,1H, H-9, indol NH) , 7.59-6.99 (m, 4H, $\text{H}_{\text{ar-5}}$, $\text{H}_{\text{ar-6}}$, $\text{H}_{\text{ar-7}}$, $\text{H}_{\text{ar-8}}$), 4.48 (ma, 1H, H-1), 4.27-4.09 (m, 2H, H-3', CH_2), 3.4-2.7 (6H, H-1', H-3, H-4, 3 x CH_2), 1.25 (t, 3H, H-4', CH_3) ; **RMN ^{13}C** (75 MHz, CDCl_3): δ (ppm)= 173.14 (C, CO_2Et), 135.55 (Cq), 134.82 (Cq), 127.12 (Cq), 121.71 (CH), 119.26 (CH), 118.08 (CH), 110.95 (CH), 108.93 (Cq), 61.05 (CH_2 , C-3'), 48.78 (CH, C-1), 41.92 (CH_2 , C-3), 40.73 (CH_2 , C-1'), 22.49 (CH_2 , C-4), 14.13 (CH_3 , C-4') ; **IR** [KBr, cm^{-1}]: 3475.61 (N-H, indol), 3000, 2936, 1721.71 (CO_2Et), 1609,1460.

Con el fin de caracterizar la mezcla, se determinó su perfil cromatográfico en HPLC bajo dos condiciones diferentes (el radio enantiomérico fue de aproximadamente 1:1 en ambos casos):

- 1) Columna Chiralpak IA; fase móvil: Hex / iPrOH / Net_3 90/10/0.1; flujo 0.8 mL/min, concentración de la muestra: 1mg/ml; $T_{\text{RE}1}$ = 14.27 (R), $T_{\text{RE}2}$ = 15.47 (S).
- 2) Columna Chiralpak IA; fase móvil: Hex / iPrOH / Butilamina 80/20/0.1; flujo 1 mL/min, concentración de la muestra: 1mg/ml; $T_{\text{RE}1}$ = 6.706 (R), $T_{\text{RE}2}$ = 7.942 (S).

6.2.9. Compuesto C4a. Síntesis de 1-(2-etoxi-2-oxoetil)-3,4-dihidro- β -carbolina.

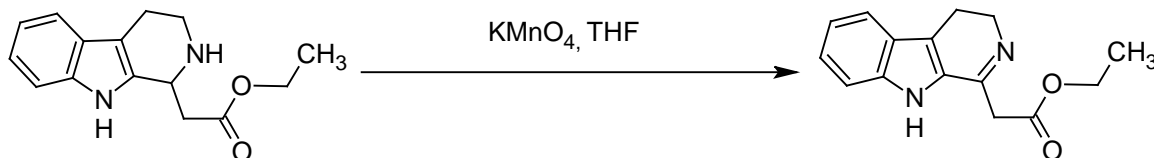


Figura 24. Síntesis del compuesto C4a.

En un matraz de dos bocas provisto con un embudo de adición el cual contenía con 3.72 g de permanganato de potasio, se colocaron 1.24 g de C4 y 90 ml de THF como disolvente, la mezcla se puso en agitación a una temperatura de $\sim 0^\circ\text{C}$. Una vez que se disolvió el sólido se agregó una pequeña cantidad de permanganato de potasio manteniendo la agitación y la temperatura constantes. El permanganato se agregó a la reacción en 6 adiciones, cada una 15 minutos llevando un control del avance de reacción mediante CCF y manteniendo la agitación y la temperatura en un rango de -3°C a 0°C . Se dejó en agitación a las mismas condiciones y se detuvo después de tres horas, el contenido del matraz se filtró y el sólido se lavó con THF frío, se concentró a presión reducida y el sólido resultante se disolvió en diclorometano para dejar secar a vacío durante la noche. Se obtuvo cuantitativamente un sólido amarillo opaco que se utilizó directamente en la siguiente reacción (6.2.10).

6.2.10. Compuesto C4b. Síntesis 1*R*-(2-etoxi-2-oxoetil)-1,2,3,4-tetrahidro-β-carbolina.

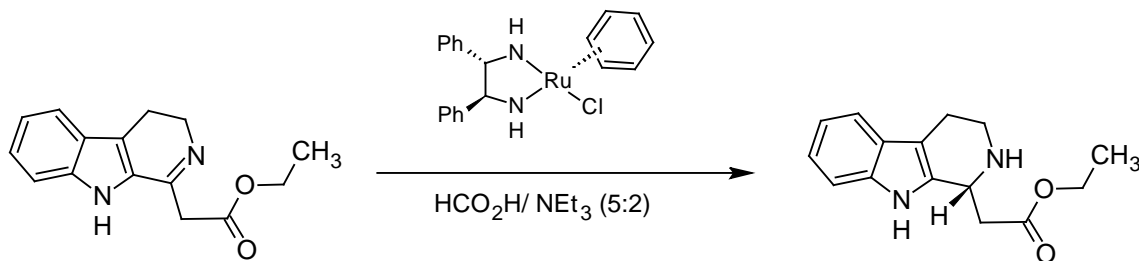


Figura 25. Síntesis del compuesto C4b.

En un matraz de dos bocas seco se hicieron reaccionar durante 30 minutos (T.A) 176mg de (1*S*,2*S*)-*N*-Tosil-1,2-difeniletildiamina y 120 mg del dimero de dicloro(η^6 -bencen)rutenio en CH₃CN (20 ml) (matraz 1). Por otro lado, la imina (C4a) se disolvió en 48ml de acetonitrilo a 0°C (matraz 2). En un tercer matraz, se preparó una mezcla 5:2 de HCO₂H/NEt₃ (2.5 ml) que se enfrió a 0°C y se mantuvo en corriente de argón. Posterior a los 30 minutos la mezcla contenida en el matraz 1 se enfrió y el contenido de los matraces 2 y 3 se vertió en 1 gota a gota y de manera sucesiva via cánula de doble vía. La mezcla de reacción se dejó en agitación y a 0°C → T.A durante la noche. Posteriormente, previo análisis en CCF la reacción se trató con K₂CO₃ (pH≈9), se extrajo con AcOEt (4x50) y la fase orgánica se lavó con agua y salmuera, se secó con Na₂SO₄ anhidro y se concentró a PR. El producto crudo se purificó mediante cromatografía en columna flash sucesivas con las siguientes condiciones: 1) gel de sílice, malla 230-400, (1:40), eluyente AcOEt 100% + 1% TEA, 2) gel de sílice, malla 230-400, (1:80), eluyente AcOEt 100% + 1% TEA. Se obtuvo un semisólido amarillo claro. **Rendimiento:** 30%.

Empleando las condiciones (1) previamente descritas para la mezcla racémica se determinó un exceso enantiomérico del 81% (*re*= 90.5: 9.5), (Fig. 26). Dicha mezcla se empleó para la preparación de los derivados C4c y C5.

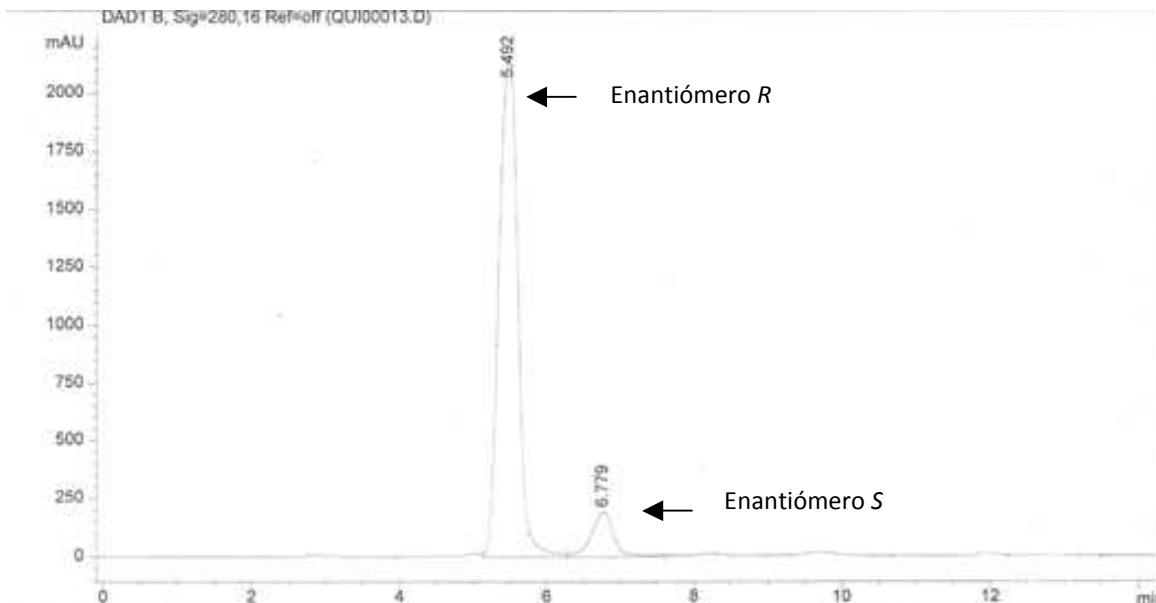


Figura 26. Cromatograma de (1R)-(2-etoxi-2-oxoetil)-1,2,3,4-tetrahydro- β -carbolina.

6.2.11. Compuesto C4c. Síntesis del 1R-(2-etoxi-2-oxoetil)-2-benciloxicarbonil-1,2,3,4-tetrahydro- β -carbolina.

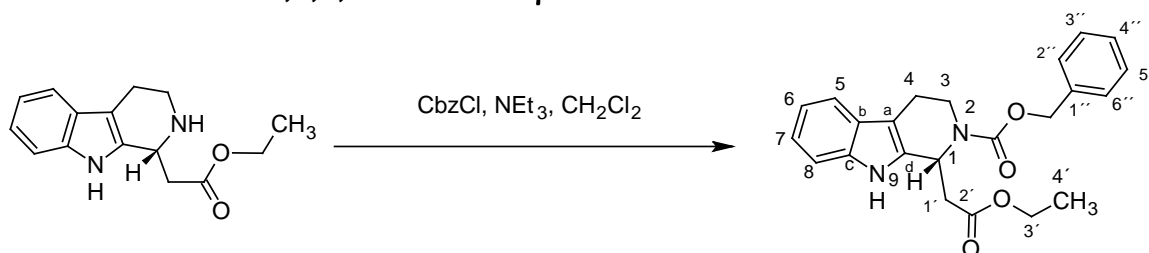


Figura 27. Síntesis del compuesto C4c.

En un matraz de tres bocas en presencia de argón y provisto de agitación se colocaron 370 mg de C4b, 1.4 ml de diclorometano, 0.7 ml de trietilamina y DMAP en cantidad catalítica (0°C). Simultáneamente, en un segundo matraz se disolvieron 330 mg de CbzCl en 2ml de diclorometano en presencia de argón a 0°C; esta mezcla se agregó cuidadosamente en el primer matraz en presencia de argón y se dejó en agitación a 0°C. Aproximadamente 14 horas después (0°C, T.A) se detuvo la reacción y se agregaron 5ml de agua y 5ml de ácido clorhídrico 2.0 N; se separaron las fases y la fracción orgánica se lavó con agua (3 x 5 ml),

SS NaHCO_3 (3 x 5ml) y salmuera. Dicha fase se secó con Na_2SO_4 anhidro y se filtró. El filtrado se concentró PR para dar en forma cuantitativa un semisólido (C4c). El producto se utilizó en la siguiente reacción directamente (6.2.12).

6.2.12. Compuesto C5. Síntesis de 1*R*-(2-etoxi-2-oxoetil)-2-benciloxicarbonil-9-*tert*-butiloxicarbonil-1,2,3,4-tetrahydro- β -carbolina.

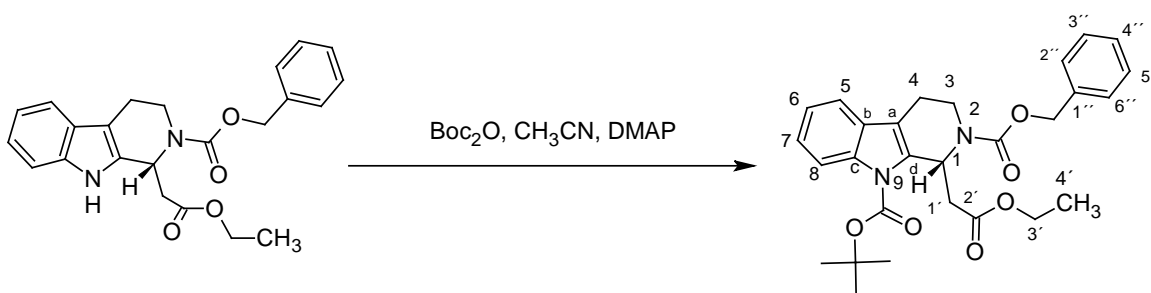


Figura 28. Síntesis del compuesto C5.

Una solución del ácido 2,2-dimetil propionico anhidro (266 mg) en CH_3CN (3 ml) y DMAP (32 mg) se adicionaron a una solución de C4c (370 mg) en CH_3CN acetonitrilo (3 ml) y se dejó en agitación a temperatura ambiente por 12 horas. La reacción se detuvo mediante la adición de 6 ml de HCl 0.4M. Después de la separación de la fase orgánica, la fase acuosa se extrajo con CH_2Cl_2 (2 x 15 ml). Se reunieron las fases orgánicas y se lavaron con una solución saturada de NaHCO_3 y salmuera. Dicha reunión se filtró y concentró a PR para obtener cuantitativamente el producto C5 como un semisólido ligeramente café. La purificación se efectuó por medio de cromatografía flash en gel de sílice (1:20; 230-430) empleando como eluyente una mezcla de n-Hexano/AcOEt (4:1).

Rendimiento: 100%; **RMN ^1H** (300MHz, CDCl_3): δ (ppm)= 8.18 (d, J = 6Hz, 1H_{ar}), 7.5-7.25 (m, 8H_{ar}), 6.32 (m, 1H), 5.16 (2 x s, 2H), 4.47 (m, 1H), 4.08 (m, 2H), 3.34-2.6 (m, 5H), 1.73 (s, 3H, CH_3), 1.60 (s, 6H, 2 x CH_3), 1.17 (m, 3H, CH_3); **IR** [KBr , cm^{-1}]: 2980, 1730, 1457, 1425, 1140.

6.2.13. Compuesto C6. Síntesis del ácido 1,2,3,4-tetrahidro- β -carbolin-3S-carboxílico.

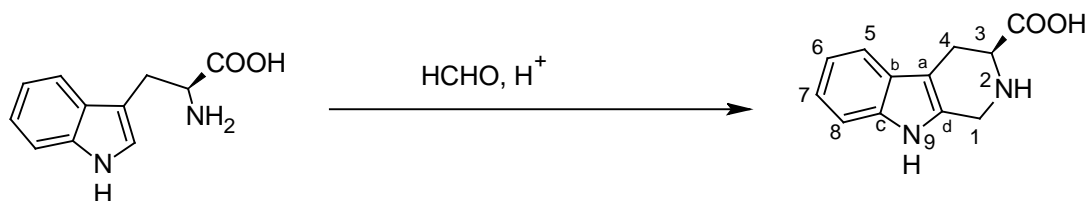


Figura 29. Síntesis del compuesto C6.

En un matraz se colocaron 5 g de L-Triptófano disueltos en 100 ml de una mezcla H_2O/H_2SO_4 (3:1), posteriormente se adicionaron 8 ml de formaldehído (HCHO) y la mezcla se puso en agitación a temperatura ambiente durante 2.5 h; se ajustó el pH a 6-7 con hidróxido de amonio (NH_4OH). Después se colocó en refrigeración y se dejó en congelación durante la noche. La muestra se descongeló en un baño de agua sin calentamiento, una vez descongelada se filtró y se observó un precipitado amarillento, este se lavó varias veces con MeOH y se obtuvo un sólido amarillo claro.

Rendimiento: 64%; **p.f.:** 227-230; **RMN 1H** (300MHz, DMSO): δ (ppm)= 10.97 (s, 1H, H-9, indol NH), 7.49-7.43 (2 x d, , $J=8.4, 8.1$ Hz, 2H, H_{ar-5}, H_{ar-8}), 7.16-6.95 (m, 2H, H_{ar-6}, H_{ar-7}), 4.45-2.79 (m, 5H, H-3, H-4 CH_2 , H-1); **RMN ^{13}C** (75.4 MHz, DMSO): δ (ppm)= 169.78 (C, $\underline{C}O_2H$), 136.34 (Cq), 128.82 (Cq), 126.27 (Cq), 121.45 (CH), 119.38 (CH), 117.88 (CH), 109.84 (CH), 107.46 (Cq), 56.22 (CH, C-3), 39.44 (CH, C-1), 22.78 (CH_2 , C-4); **IR** [KBr, cm^{-1}]: 3439.18 (N-H, indol), 2956.66~2782.65 (CH), 1632.55 ($\underline{C}O_2H$), 1453, 1398, 1301, 1028, 751.

6.2.14. Compuesto C7. Síntesis del ácido 1-metil-1,2,3,4-tetrahydro- β -carbolin-3S-carboxílico.

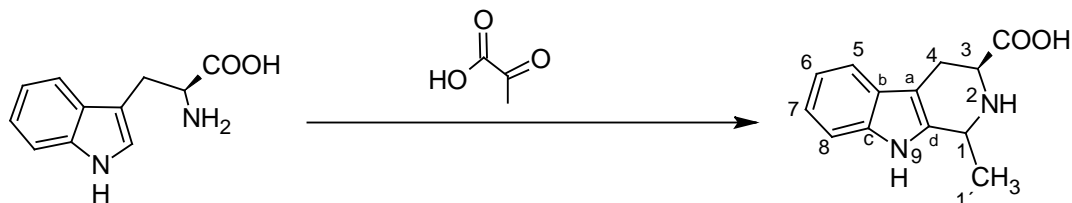


Figura 30. Síntesis del compuesto C7.

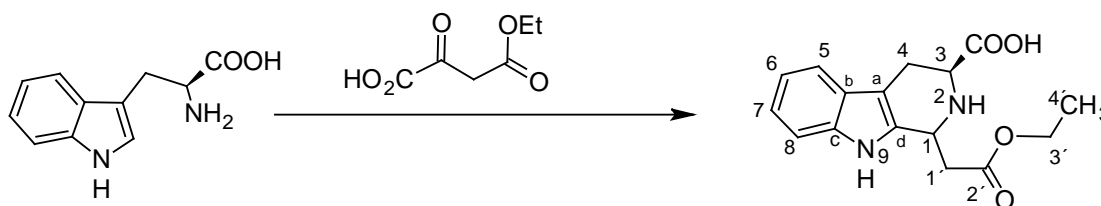
En un matraz de dos bocas se hicieron reaccionar 500mg de L-tryptófano disuelto en 10 ml de una mezcla H₂O/H₂SO₄ (3:1) con 0.35 ml de ácido pirúvico (1.1 eq). La mezcla permaneció en agitación y temperatura ambiente durante 72 h y una vez transcurrido este tiempo se adicionaron unas gotas de hidróxido de amonio para llegar a un pH \approx 7 y se refrigeró. Al cabo de tres semanas se filtró el precipitado formado obteniéndose un sólido blanco-amarillento muy fino.

Rendimiento: 65%; **p.f.:** 214-216; **¹H RMN** (300MHz, DMSO-*d*₆ + D₂O): δ (ppm)= 7.38 (t, J = 9.0 Hz, 2H, H_{ar}-5, H_{ar}-8), 7.06 (td, , J = 7.5 Hz, J = 1.2 Hz, 1H), 6.97 (td, J = 7.5Hz, J = 0.9 Hz, 1H), 4.1 (1H, H-1), 3.95 (dd, J = 12Hz, J = 5.1 Hz, 1H, H-3), 3.22 (dd, J = 16Hz, J = 5.1Hz, 1H, H-4 _{α}), 2.86 (dd, J = 16Hz, J = 12Hz, 1H, 4-H _{β}), 1.74 (s, 3H, CH₃); **¹³C RMN** (75 MHz, DMSO+*d*₆): δ (ppm)= 171.49 (C, C=O₂H), 170.86 (C, C=O₂H, 2^o diastereoisómero), 136.77 (Cq), 132.46 (Cq), 126.19 (Cq), 122.60 (CH), 119.89 (CH), 118.75 (CH), 112.41(CH), 105.06 (Cq), 62.01, 53.46, 23.94 (CH₃, C-1'), 23.23 (CH₃, C-1', 2^o diastereoisómero); **EM-IE** (m/z, %): 230 [M⁺, 85], 215 [M-CH₃, 35], 185 [25], 183 [55], 44 [100] ; **IR** [KBr, cm⁻¹]: 3430.90 (N-H, indol), 3203-2797.8, 1635.7 (C=O₂H), 1614.55 (C=O₂H), 1394, 1358, 1315, 1232; **UV** (λ _{max}, en H₂O) nm: 220.

HPLC (NUCLEODEX beta-PM, TEAA 1% pH4 / MeOH 70/30, flujo: 0.7ml/min, 162bar).

Cuadro 1. Tiempo de retención (T.R), área bajo la curva (ABC) y radio diastereoisomérico (rd) de la mezcla C7.

Pico	TR (min)	ABC (%)	rd
1	2.257	52.0754	5:3
2	2.558	30.5303	

6.2.15. Compuesto C8. Síntesis de ácido 1-(2-etoxi-2-oxoetil)-1,2,3,4-tetrahidro-β-carbolin-3S-carboxílico.**Figura 31. Síntesis del compuesto C8.**

En un matraz de dos bocas se hicieron reaccionar 500mg de L-Triptófano disueltos en 10 ml de una mezcla H₂O/H₂SO₄ (3:1), con el ácido carboxipirúvico en agitación a temperatura ambiente (T.A). Después de 24h se observó un precipitado en el matraz del cual se tomó CCF y se observó la formación de un producto, sin embargo, aun había sustrato por lo cual la reacción continuo en agitación a T.A durante 72hs más. Se filtró el precipitado y se lavó con agua fría, se obtuvo un sólido amarillo claro.

Rendimiento: 10%; **p.f.:** 200-203; **RMN ¹H** (300MHz, DMSO): δ(ppm)= 10.97 (s, 1H, H-9, indol NH), 7.43-7.4 (2 x d, J= 7.8, 8.1Hz, 2H, H_{ar}-5, H_{ar}-8), 7.07-6.97 (2 x t, J= 7.5, 7.5 Hz, 2H, H_{ar}-6, H_{ar}-7), 4.12 (m, 3H, 1-H, CH₂-3'), 3.59 (d, J= 16.5 Hz, 2H, CH₂-1'), 3.0 (dd, J= 15.3, 4.2 Hz, 1H), 2.6 (m, 2H), 1.17 (t, J= 7.2 Hz, 3H, CH₃-4'); **RMN ¹³C** (75.4 MHz, DMSO): δ(ppm)= 173.63, 173.45, 170.29, 136.38 (Cq),

131.24 (Cq), 123.77 (Cq), 121.39 (CH), 118.56 (CH), 117.94 (CH), 111.32 (CH), 108.04 (Cq), 60.27, 59.63, 52.90, 43.83, 24.19, 13.93; **EM-IE** (m/z, %): 302 [M^{+} , 38], 215 [100], 169 [70], 44 [63]; **IR** [KBr, cm^{-1}] 3367.64 (N-H, indol), 3184.32-2985.4 (CH), 1711.01 (\underline{CO}_2Et , \underline{CO}_2H), 1340, 1225, 1162. **UV** (λ_{max} en H_2O) nm: 219.

HPLC (NUCELODEX beta-PM, TEAA 1% pH4 / MeOH 70/30, flujo: 0.7ml/min, 162bar)

Cuadro 2. Tiempo de retención (T.R), área bajo la curva (ABC) y radio diastereoisomérico (rd) de producto C8.

Pico	TR (min)	ABC (%)	rd
1	2.295	36.2573	2:3
2	2.524	63.7427	

6.2.16. Compuesto C9. Síntesis del éster metílico del ácido 1,2,3,4-tetrahydro- β -carbolin-3S-carboxílico.

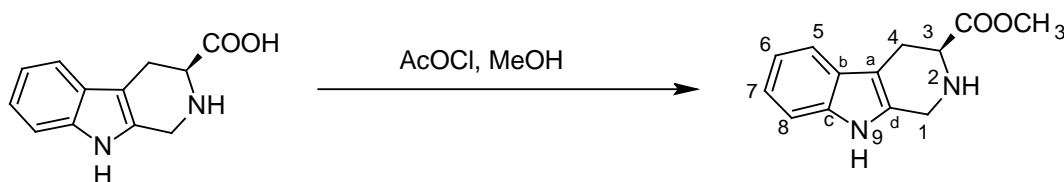


Figura 32. Síntesis del compuesto C9.

En un matraz de tres bocas en condiciones de atmosfera inerte provisto de refrigerante y una trampa con solución básica, se colocaron 6 ml de metanol y se dejo en agitación a $-5^{\circ}C$; después de aproximadamente 5 min se agregaron cuidadosamente 1.5 ml de AcOCl manteniendo la agitación. Una vez terminada la adición la mezcla se dejo en agitación durante ~ 10 min y se llevó a una temperatura de $-5^{\circ}C$. Posteriormente se agrego 1 g de C6 en presencia de argón. Posteriormente la mezcla se llevó a $60^{\circ}C$ (reflujo) durante tres horas. El contenido

del matraz se trató con solución saturada de bicarbonato de sodio y se extrajo con acetato de etilo (20ml x 2). La fase orgánica se lavó con salmuera y se secó con Na_2SO_4 anidro, se filtró y se concentró. La muestra se sometió a una cromatografía en columna flash con las siguientes condiciones: gel de sílice, malla 230-400, (1:50), elución en gradiente con mezclas de AcOEt /MeOH (100/0 a 0/100). Se obtuvo un sólido muy fino de color café claro (<10%, **p.f.**:239-242). Este producto se empleó directamente en la generación de C11 (6.2.18).

6.2.17. Compuesto C10. Síntesis del éster metílico del ácido 1-metil-1,2,3,4-tetrahidro- β -carbolin-3S-carboxílico.

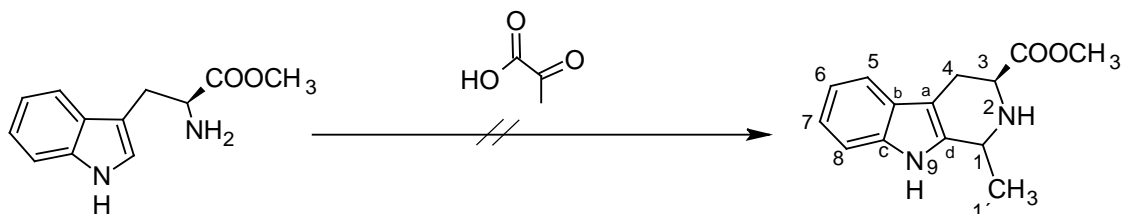


Figura 33. Síntesis del compuesto C10.

En un matraz de dos bocas provisto con atmósfera inerte, se agregaron 500mg del éster metílico del L-triptófano disuelto en 10 ml de una mezcla $\text{H}_2\text{O}/\text{H}_2\text{SO}_4$ (3:1). La mezcla se agitó y posteriormente se agregaron 0.35 ml de ácido pirúvico (1.1 eq). La mezcla permaneció en agitación y temperatura ambiente durante 72 h; una vez transcurridos este tiempo se adicionaron unas gotas de hidróxido de amonio para llegar a un pH~7 y se refrigeró. Al cabo de tres semanas se filtró el precipitado formado obteniéndose un sólido blanco-amarillento muy fino. La fase acuosa se extrajo con n-butanol (2x25), se concentró a presión reducida y el residuo se lavó con DCM para luego filtrarlo y obtener un sólido marrón (71%, **p.f.**: > 270°C).

Sin embargo, el producto resultó ser el ácido libre de C10 debido a la hidrólisis del éster.

6.2.18. Compuesto C11. Síntesis del éster metílico del ácido 2-benciloxicarbonil-1,2,3,4-tetrahidro- β -carbolin-3S-carboxílico.

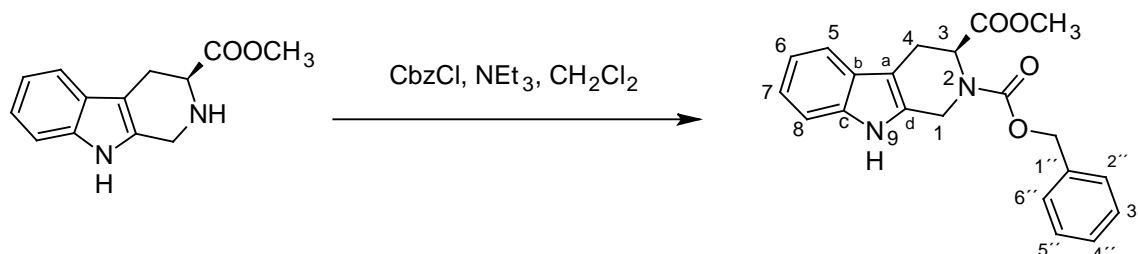


Figura 34. Síntesis del compuesto C11.

Una disolución de CbzCl (653 mg, 3.83 mmol) en DCM (2 ml) a 0°C en atmósfera de argón, se adicionó gota a gota sobre una disolución previamente preparada de C9 (730 mg), DMAP (cat.) y trietilamina (1.3 ml, 9.6 mmol) en DCM (2.8 ml) bajo las mismas condiciones. La mezcla de reacción se mantuvo en agitación durante 20 h (0°C, T.A.). Posteriormente, se agregaron 5 ml de H₂O y 5 ml de HCl 2.0N. La fase orgánica se separó y se lavó con H₂O (2 x 5 ml). Después, se secó con Na₂SO₄ anhidro y se concentró a PR. El producto crudo se purificó por medio de cromatografía flash empleando gel de sílice (230-400) y como eluyente mezclas de polaridad ascendente (Hexano/ AcOEt, 100:0 a 0:100) para dar un semisólido café claro.

Rendimiento: <10%; **p.f.:** ND; **RMN ¹H** (300MHz, CDCl₃): δ (ppm)= 7.6-7 (m, 9H_{ar}), 5.2 (s, 2H, -COOCH₂-Ph), 5.2 (m, 1H), 4-3.8 (m, 2H), 3.8 (s, 3H, OCH₃), 3.6 (m, 1H), 3 (m, 1H); **EM-IE** (m/z, %): 364 [M⁺, 15], 229 [M-Cbz, 100], 169 [45], 143 [20], 91 [63]; **IR** (Sol/CHCl₃): cm⁻¹ 3468.22 (N-H, indol), 3031.68, 2955.83-2855.62, 1736.81 (CO₂Me), 1703.38 (Cbz), 1450, 1414, 1329, 1282, 1239.

6.2.19. Compuesto C12. Síntesis del ácido 1,2,3,4-tetrahidro- β -carbolin-3*R*-carboxílico.

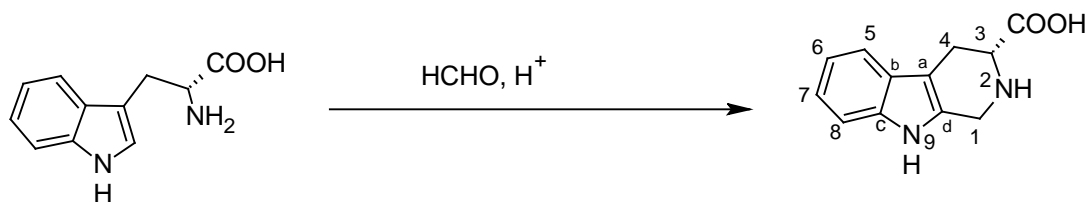


Figura 35. Síntesis del compuesto C12.

En un matraz se colocaron 1.2 g de D-Triptófano (24.5 mmol) disueltos en 26.3 ml de una mezcla H₂O/H₂SO₄ (3:1), posteriormente se adicionaron 2ml de formaldehído (37%) y la mezcla se mantuvo en agitación a temperatura ambiente durante 2.5 h; se ajustó el pH a 6 con hidróxido de amonio, se tapó y colocó en refrigeración. Posteriormente se filtró y se lavó con H₂O y se secó en desecador. Se obtuvo un sólido color café claro (99.3%; **p.f.:**208-212).

Los espectros de IR, EM, RMN ¹H y ¹³C concuerdan con los informados para su enantiómero C6 (6.2.13).

6.2.20. Compuesto C13. Síntesis del ácido 1-metil-1,2,3,4-tetrahidro- β -carbolin-3*R*-carboxílico.

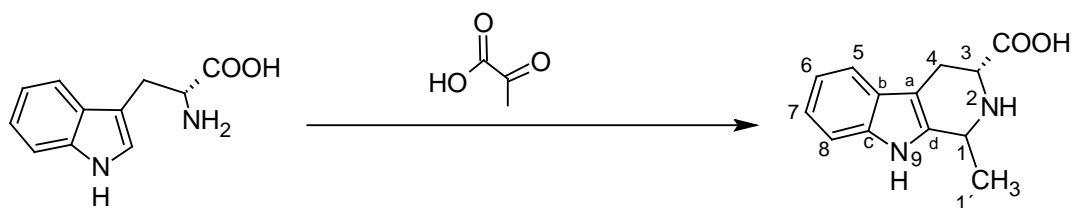


Figura 36. Síntesis del compuesto C13.

En un matraz de dos bocas en presencia de atmósfera inerte, se agregaron 300mg de D-triptófano en 6 ml de una mezcla (3:1) de H₂O/H₂SO₄. Posteriormente, se agregaron 0.25ml de ácido pirúvico (1.1 eq) a la mezcla en agitación. La reacción permaneció en agitación y temperatura ambiente durante 24

h. Después se adicionó hidróxido de amonio para llegar a un pH~7 y se enfrió. Una semana después se filtró en frío el precipitado formado y se colocó en desecador. Se obtuvo un sólido blanco- amarillento muy fino de manera cuantitativa (p.f.:220-221).

Los datos espectroscópicos coinciden con lo encontrado para C7 (6.2.14).

6.2.21. Compuesto C14. Síntesis de ácido 1-(2-etoxi-2-oxoetil)-1,2,3,4-tetrahydro-β-carbolin-3R- carboxílico.

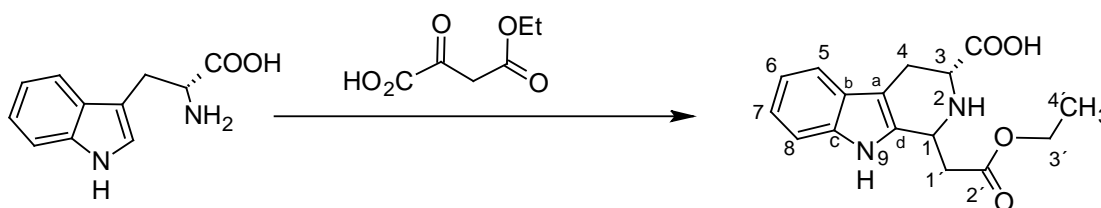


Figura 37. Síntesis del compuesto C14.

En un matraz de dos bocas se colocaron 500 mg de D-Triptófano que fueron disueltos en 10 ml de una mezcla H₂O/H₂SO₄ (3:1). En una de las bocas se colocó atmósfera inerte (argón) mientras por la otra se agregó el ácido carboxipirúvico. Se tapó el matraz y se dejó en agitación a temperatura ambiente. Después de 4 días, se filtró el precipitado formado y se lavó con agua fría para obtener un sólido color amarillento (15%; p.f.:200-202).

Las características espectroscópicas de RMN ¹H y ¹³C e IR fueron idénticas a C8 (6.2.15).

6.2.22. Compuesto C15. Síntesis del éster metílico del ácido 1,2,3,4-tetrahydro-β-carbolin-3R-carboxílico.

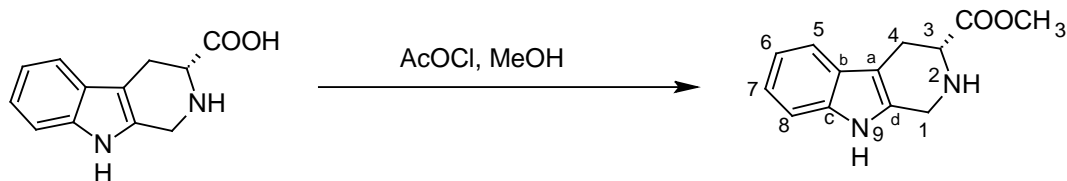


Figura 38. Síntesis del compuesto C15.

En un matraz de tres bocas en condiciones de atmosfera inerte provisto de refrigerante y una trampa con solución básica, se colocaron 3 ml de metanol y se dejó en agitación a -5°C ; después de aproximadamente 5 min se agregó cuidadosamente 1ml de AcOCl manteniendo la agitación. Una vez terminada la adición la mezcla se dejó en agitación durante ~ 10 min y se llevó a una temperatura de -5°C . Posteriormente, se agregaron 500 mg de C12 en presencia de argón; la mezcla se puso en agitación y se llevó a temperatura ambiente, después, se mantuvo en 60°C durante tres horas. El contenido del matraz se trató con disolución saturada de bicarbonato de sodio y se disolvió en DCM, se separaron las fases y la fracción orgánica se concentró a presión reducida. La muestra se sometió a una cromatografía en columna flash empleando gel de sílice (230-400,1:100), y mezclas de AcOEt / MeOH (100:0 a 0:100) como eluyente. Finalmente se obtuvo el producto como un sólido amarillo-naranja.

Rendimiento: 10%; **p.f.:**237-240; **RMN ^1H** (300MHz, CDCl_3 + $\text{DMSO-}d_6$): δ (ppm)= 9.43 (s, 1H, H-9, indol NH), 7.45 (d, $J= 7.5$ Hz, 1H, H_{ar} -8), 7.33 (d, $J= 6.6$ Hz, 1H, H_{ar} -5), 7.19-7.03 (m, 2H, 6- H_{ar} , 7- H_{ar}), 4.21 (d, $J= 8.4$ Hz, 2H, H-1), 3.88 (dd, $J=9.6, 4.8$ Hz, 1H, H-3), 3.80 (s, 3H, CO_2CH_3), 3.2-2.9 (m, 2H, H-4); **RMN ^{13}C** (75 MHz, CDCl_3 + $\text{DMSO-}d_6$): δ (ppm)= 173.14 (Cq, CO_2CH_3), 136.25 (Cq), 131.51(Cq), 126.96 (Cq), 121.38 (CH), 119.09 (CH), 117.59 (CH), 111.09 (CH), 10.36 (Cq), 55.87 (CH₃, CO_2CH_3), 52.27, 42.07, 25.04; **EM-IE** (m/z, %): 230 [M^{++} , 45], 185 [40], 171 [M- CO_2CH_3 , 38], 143 [100]; **IR** [KBr, cm^{-1}]: 3395.13 (N-H, indol), 3054.08-2853.05 (CH), 1742 (CO_2CH_3), 1442.9, 1377.9, 1350; **UV** (λ_{max} en MeOH) nm: 223.5.



6.3. Evaluación de la actividad citotóxica de las β -carbolinas en líneas celulares de cáncer humano por el método de sulforrodamina B.

La evaluación biológica se realizó en la unidad de pruebas biológicas del Instituto de Química.

6.3.1. Fundamento del método analítico

Comúnmente, en los estudios de citotoxicidad *in vitro* sobre líneas celulares, se emplean diferentes métodos de tinción celular con el fin de estimar de manera indirecta el número de células viables presentes después de un tratamiento (Escobar y cols., 2010).

La Sulforrodamina B (SRB) es un colorante aniónico que se une electrostáticamente a proteínas aniónicas (PTS) de células cancerosas que han sido precipitadas con ácido tricloroacético (TCA) en el fondo de micropozos. El complejo SRB-PTS es solubilizado con buffer, lo que facilita medir la densidad óptica (DO) de los micropozos. La DO es directamente proporcional al crecimiento celular e inversamente proporcional al grado de citotoxicidad de un compuesto de prueba (Ibañez, 2004).

6.3.2. Compuestos de prueba

La evaluación preliminar de la actividad citotóxica de cada compuesto de prueba se realizó a una concentración de 50 μ M. Se utilizó doxorubicina como control positivo.

6.3.3. Líneas celulares

Las líneas celulares de cáncer humano utilizadas en el estudio fueron las siguientes: **PC-3** (cáncer de próstata), **MCF-7** (cáncer de mama), **K562** (leucemia), **U251** (SNC), **HCT-15** (cáncer de colon) y **SKLU-1** (pulmón).

Cada línea celular fue cultivada en medio RPMI 1640 suplementado con suero fetal bovino (10%), L-glutamato (2mM), penicilina (1%). Los cultivos se incubaron a 37°C, humedad del 95%, en una atmósfera con un 5% de CO₂.



6.3.4. Evaluación

Posterior al cultivo, las células adherentes fueron separadas por procedimientos convencionales con una solución de tripsina-EDTA para obtener las suspensiones celulares. La cantidad de células viables de cada línea celular se determinó empleando el método de exclusión del azul de tripano en un hematocitómetro.

En una placa de Elisa de 46 posos se colocaron de 5 000 a 10 000 células viables (dependiendo de cada línea celular) y se incubaron a 37°C durante 24h. Una vez transcurrido el tiempo, las células se trataron con los compuestos de prueba e incubadas durante 48 horas. Posteriormente las células se fijaron *in situ* por adición de 50µl de una solución fría de ácido tricloroacético al 50% p/v.

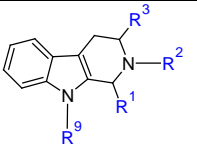
Las células ya fijas fueron incubadas durante 30 minutos a temperatura ambiente con una solución de sulforrodamina B al 0.4% (SRB). Después de este tiempo se eliminó el exceso de la solución colorida en las placas de Elisa y se efectuaron lavados con ácido acético al 1% y se secaron a la intemperie.

Los complejos proteína-SRB se disolvieron en una solución amortiguadora Tris(hidroximetil)aminometano. La densidad óptica de las soluciones en cada pozo se determinó en un lector de Elisa a 515 nm.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Todos los compuestos fueron sintetizados mediante la reacción de condensación de Pictet-Spengler de la triptamina o el L/D-Triptófano con el correspondiente aldehído o cetoácido (figs. 14 y 15). En los cuadros 3 y 4 se ilustran los compuestos obtenidos, así como algunas características y el rendimiento en el cual fueron obtenidos. **C4**, **C7**, **C8**, **C13** y **C14** corresponden a las mezclas diastereoisoméricas (R/S en Carbono 1) que en este estudio preliminar se analizaron como tales.

Cuadro 3. Tetrahydro-β-carbolinas sintetizadas

			R ¹	R ²	R ³	R ⁹
Derivados de Triptamina	C1		H	H	H	H
	C2		CH ₃	H	H	H
	*C3		CH ₃	---	---	H
	C4		CH ₂ CO ₂ Et	H	H	H
	C5		CH ₂ CO ₂ Et	Cbz	H	Boc
Derivados de Triptófano	C6		H	H	—COOH	H
	C7		CH ₃	H	—COOH	H
	C8		CH ₂ CO ₂ Et	H	—COOH	H
	C9		H	H	—COOMe	H
	C10		CH ₃	H	—COOMe	H
	C11		H	Cbz	—COOMe	H
	C12		H	HCOOH	H
	C13		CH ₃	HCOOH	H
	C14		CH ₂ CO ₂ Et	HCOOH	H
	C15		H	HCOOMe	H

*β-carbolina

**Cuadro 4. Peso molecular, punto de fusión y rendimiento de las tetrahidro- β -Carbolinas sintetizadas.**

β -Carbolina	PM	p.f (°C)	Rendimiento (%)	re ó de
C1	172	240-242	< 10%	-
C2	186	158-161	25%	-
*C3	182	195-200	16%	-
C4	258.3	199-203	55%	1:1 (R/S)
C4b	258.3	-	30%	9:1(R/S)
C5	492.6	-	100%	
C6	216	227-230	64%	-
C7	230	214-216	65%	5:3
C8	302	200-203	10%	2:3
C9	246.3	239-245	<10%	-
C10	244.3	> 270	71%	-
C11	364	-	<10%	-
C12	216	208-212	99%	-
C13	230	220-221	100%	-
C14	302	200-202	15%	-
C15	230	237-240	10%	-

* β -carbolina

Como se puede observar en las figs. 14 y 15, y en el cuadro 4, la ciclación Pictet-Spengler constituye una vía de síntesis sencilla y flexible para la obtención de tetrahidro- β -carbolinas y alcaloides análogos. Sin embargo, aunque en general los rendimientos son buenos, en algunos casos particulares es necesaria la optimización posterior.

En la literatura actual se han descrito una variedad de condiciones para efectuar la ciclación Pictet-Spengler; así, se sabe que de primera mano se puede efectuar en medio acuoso en presencia de un ácido mineral a temperatura ambiente o a reflujo dependiendo del aldehído o especie sustrato para formar la



imina. De esa manera, se emplearon dichas condiciones como primera opción, aunque dependiendo del resultado, en algunos casos se efectuó como método alternativo la ciclación en medio orgánico (etanol) a reflujo con o sin la presencia de un ácido orgánico (p. ej. **C4** y **C5**).

Por otro lado, se observó que la presencia de un grupo voluminoso disminuye la eficiencia (<20%) con la que se obtiene el producto esperado (p. ej. **C8** y **C14**). En ese sentido, recientemente (Pulka & Misicka, 2011) describieron la dependencia que sigue el tipo de ciclación (mecanismo asociado) con las condiciones de reacción empleadas para la obtención diastereoselectiva de productos impedidos estéricamente. Tomando en cuenta dichos hallazgos, es posible que se puedan obtener diastereoselectivamente **C8** y **C14**, entre otros.

Con el fin de generar los correspondientes ésteres metílicos de los derivados del triptófano (D ó L), se realizaron esterificaciones en presencia de cloruro de acetilo ó cloruro de tionilo; sin embargo, la esterificación procedió con bajo rendimiento. Así que, se propuso realizar el camino alterno, es decir, efectuar la esterificación del triptófano y la ciclación posterior; pero, aunque la esterificación con cloruro de tionilo procede de manera excelente, durante la ciclación (o en su procesamiento) el éster se pierde y el rendimiento global en ambas vías no es muy diferente.

El radio enantiomérico (**C2** y **C4**) ó el diastereoisomérico (**C7**, **C8**, **C13** y **C14**) de los productos se evaluó mediante HPLC empleando diferentes condiciones (ver Metodología). Considerando que, para fines de evaluación biológica es necesario contar con los enantiómeros ó diastereoisómeros por separado, se propuso la obtención de **C5** empleando como paso llave la reducción enantioselectiva de la imina producto de la oxidación de **C4**. Así fue posible obtener éste último en un radio enantiomérico R/S de 9:1. Por lo que esta vía constituye una alternativa a la resolución de racematos. Es importante mencionar que diferente a lo esperado, la resolución de las mezclas de los diastereoisómeros obtenidos no fue posible vía columna cromatográfica y en algunos casos ni empleando cromatografía de



líquidos de alta resolución. Por lo que, posteriormente, en continuidad con este trabajo será necesario proponer su obtención diastereoselectiva.

Los compuestos obtenidos (o mezclas, según sea el caso) fueron caracterizados por medio de técnicas espectroscópicas y espectrométricas.

Así que, una vez contando con los productos, se llevó a cabo la evaluación de la actividad citotóxica a la concentración 50 μ M empleando el modelo de SRB (Ibañez, 2004). Como se puede observar en el cuadro 8 y en la figura 39, fue posible obtener compuestos con un rango de actividad variable.

En la figura 40 se puede observar que la línea celular más sensible a los compuestos evaluados fue la de cáncer de mama (MCF-7).

Así también se observó que los compuestos más activos fueron **C5** y **C11** (90-100% de inhibición), aunque no mostraron selectividad (Cuadro 5, Fig. 39 y 40). El rasgo estructural común a estos compuestos es la presencia de un sustituyente en la posición N-2 (carbamato).

Algo muy interesante fue que a diferencia de **C6**, que es de actividad marginal, el enantiómero **C12**, derivado del D-Triptófano presentó una actividad selectiva a la línea MCF-7. Dicho compuesto es de estructura sencilla y se obtiene en un rendimiento cuantitativo. En ese mismo sentido **C4** (racemato) presentó actividad importante en la misma línea celular, pero al observar la actividad de **C4b** (R/S 9:1) se aprecia que dicho enantiómero (R) no presenta tal actividad, por lo que el resultado parece indicar que el enantiómero S es el selectivo. Dicha hipótesis tendrá que ser confirmada mediante la resolución o preparación del enantiómero S

La mezcla de diastereoisómeros **C8**, también presentó selectividad hacia la línea celular MCF-7.



Cuadro 5. Citotoxicidad de los compuestos obtenidos en líneas celulares humanas cancerosas a una concentración de 50µM.

Compuesto	% de inhibición del crecimiento por la línea celular					
	U251	PC-3	K562	HCT-15	MCF-7	SKLU-1
C1	11.6	13.29	45.19	52.93	16.04	46.12
C2	64.2	50.6	27.9	17.7	61.9	55.3
*C3	35.8	24.18	60.0	48.87	36.09	35.52
C4	30.4	55.11	26.5	26.1	91.8	53.3
C4b	ND	5.17	0	11.57	10.07	46.16
C5	100	100	100	100	100	100
C6	15.52	11.07	29.81	13.93	22.92	13.82
C7	44.3	6.12	0	2.31	12.4	17.4
C8	55.4	5.2	0	7.3	100	27.4
C9	ND	ND	ND	ND	ND	ND
C10	ND	ND	ND	ND	ND	ND
C11	100	60.89	94.27	100	99.24	100
C12	12.2	12.1	0	5	95.9	7.6
C13	5.75	19.64	12.96	1.3	2.95	2.4
C14	36.11	2.5	11.7	1.8	10.3	13.3
C15		0	0	20.98	0	6.96
Doxorrubicina (1µM)	100	68.8	100	65.1	80.0	87.9

U251=Glía del sistema nervioso central, **PC-3**= próstata, **K562**= leucemia, **HCT-15**=colon, **MCF-7**= mama, **SKLU**=pulmón; **ND**: no determinada aún.

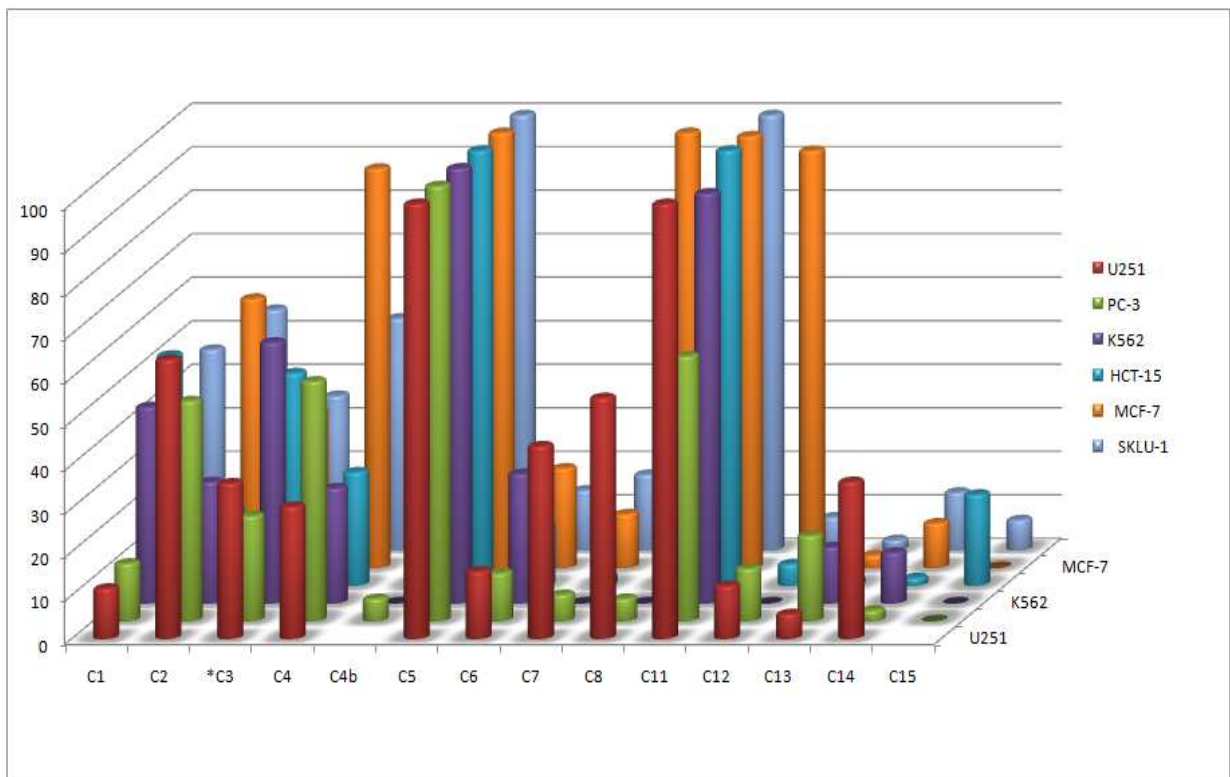


Figura 39. Citotoxicidad de las Tetrahydro- β -carbolinas y β -carbolinas sintetizadas, en células de cáncer humano a una concentración de 50 μ M.

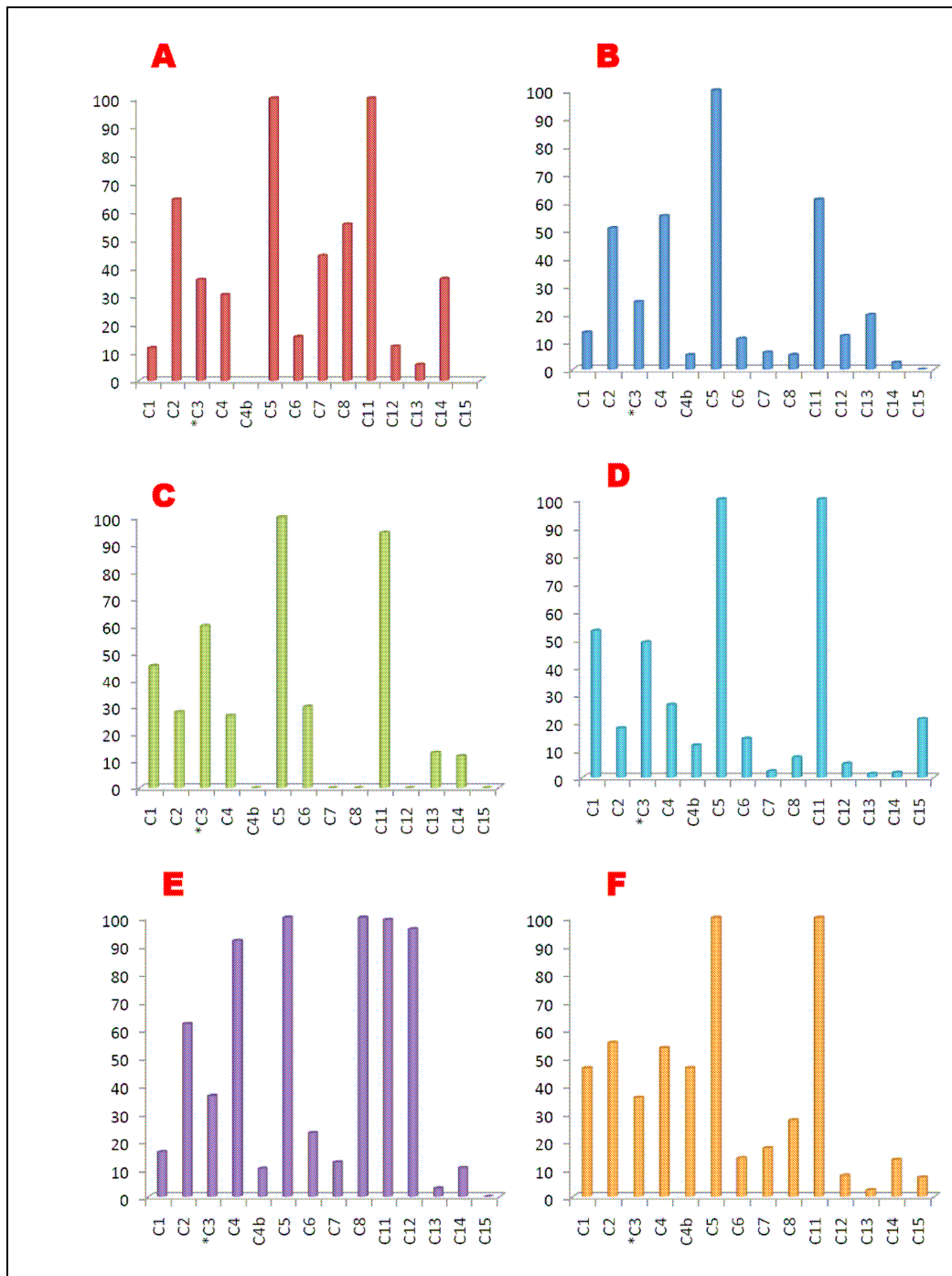


Figura 40. Sensibilidad de las líneas celulares de cáncer humano a los compuestos obtenidos. A) U251, B) PC-3, C) K562, D) HCT-15, E) MCF-7, F) SKLU-1.

Como se puede observar en la figura 41, los derivados de la triptamina, en general, presentan una actividad moderada. En cuanto a la relación entre la actividad citotóxica y la planaridad de las β -carbolinas se encontró que el compuesto **C3**, el único compuesto que está totalmente aromatizado presentó su actividad más alta frente a la línea celular K562 inhibiéndola en un 60%, mientras que su actividad frente a las demás líneas celulares estuvo por debajo del 50%; por su parte, el análogo no planar **C2** presentó una mayor actividad inhibitoria en la mayoría de las líneas celulares excepto en K562 y HCT-15, por lo tanto, este hallazgo preliminar permite inferir que para esta serie de compuestos la planaridad de la molécula no juega un papel determinante en la actividad citotóxica, de manera que es posible que el mecanismo de acción de estos compuestos no sea en su mayoría mediante la acción directa en el ADN; sin embargo, será necesario sintetizar algunos análogos más; así como, realizar estudios farmacodinámicos.

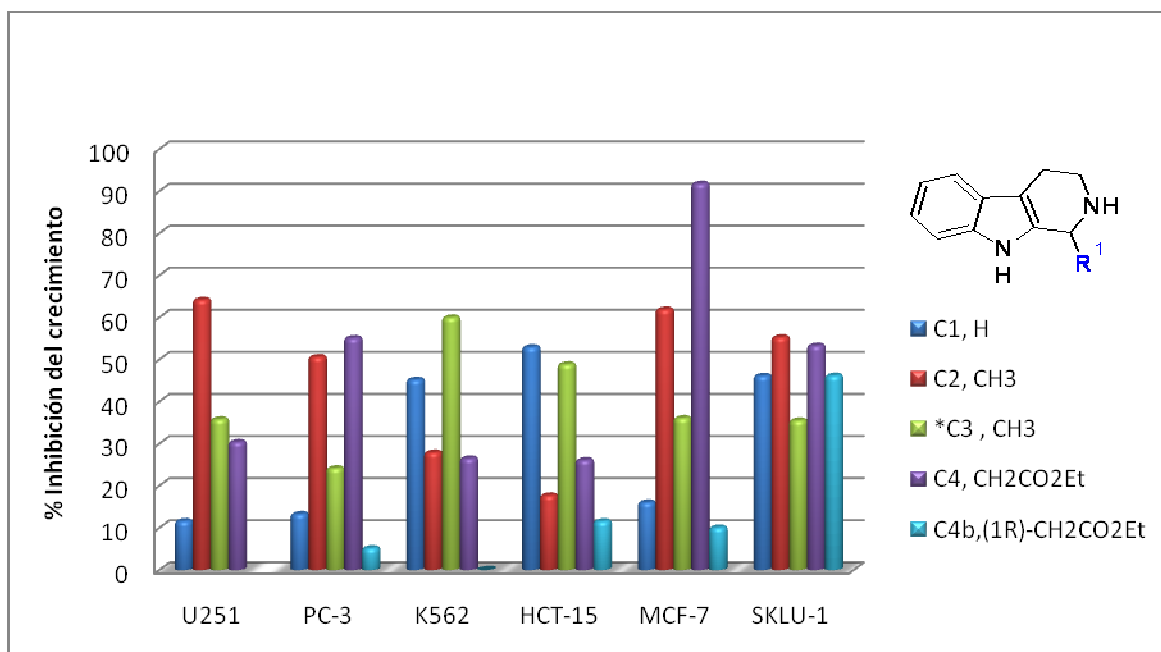


Figura 41. Citotoxicidad de los compuestos análogos a la triptamina, con respecto a la sustitución en R^1 a una concentración de $50\mu\text{M}$. * β -carbolina.

Por otro lado, se puede observar en las figuras 42 y 43 que la presencia de sustituyentes carboxilo en la posición 3, decrece la actividad citotóxica en la mayoría de los casos. Por ejemplo, cuando se tiene metilo en C-1 (Fig. 43) la introducción de los carboxilos en posición 3 disminuye la actividad citotóxica.

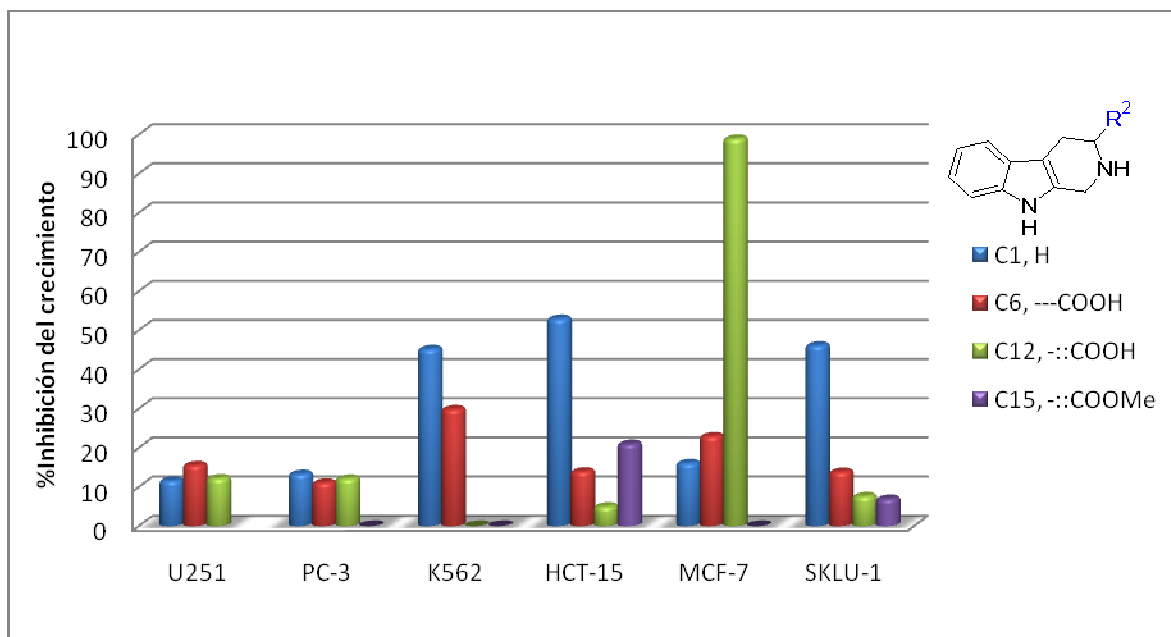


Figura 42. Citotoxicidad de algunos compuestos cuya diferencia es en la sustitución en R² a una concentración de 50µM.

Por otro lado, en la figura 44 se puede apreciar que la actividad mostrada por el racemato **C4** en SKLU-1, coincide con la encontrada para **C4b**, por lo que es probable que el enantiómero *R*, sea el responsable de tal actividad; hecho contrario al observado en la línea de cáncer MCF-7, donde nuestros resultados parecen sugerir que el enantiómero *S* es el responsable.

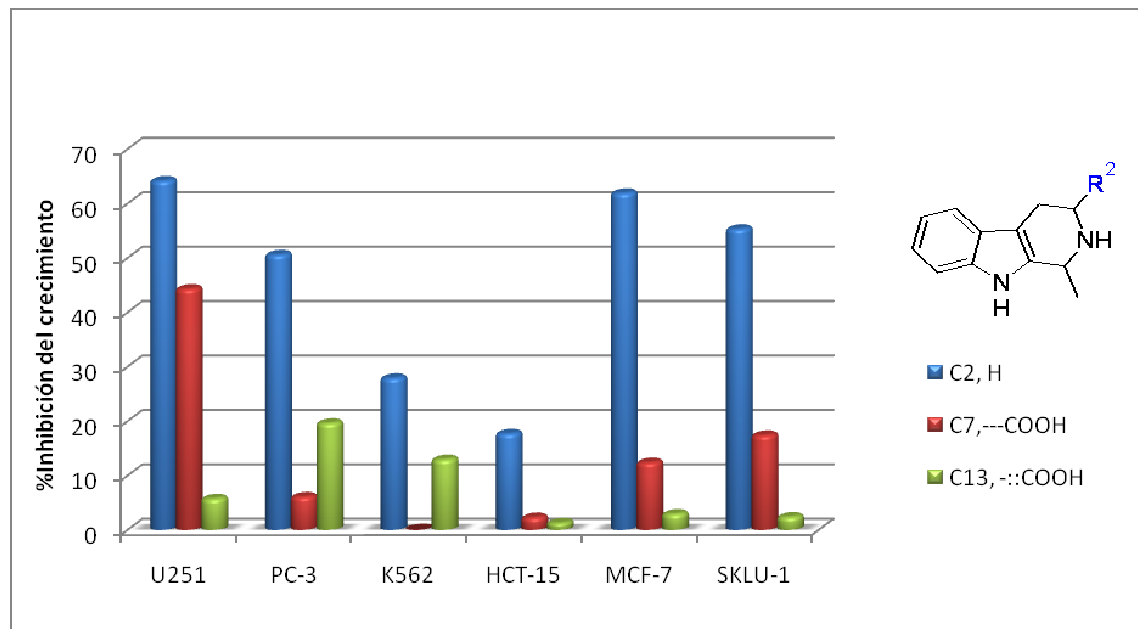


Figura 43. Citotoxicidad con respecto a la sustitución en R^2 y $R^1 = \text{CH}_3$ a una concentración de $50\mu\text{M}$.

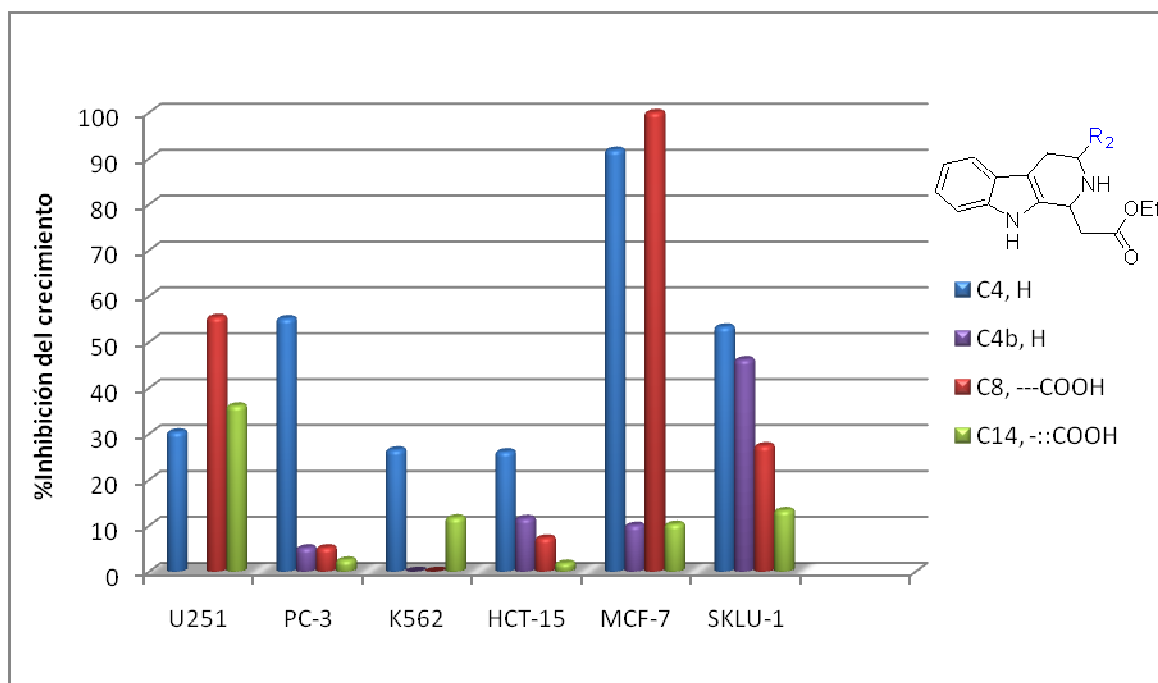


Figura 44. Citotoxicidad, a una concentración de $50\mu\text{M}$, de los compuestos que poseen un sustituyente $-\text{CH}_2\text{CO}_2\text{Et}$ en posición 1 y cuya diferencia radica en la sustitución en R^2 .



8. CONCLUSIONES

- La reacción de Pictet-Spengler constituye una estrategia sencilla y versátil que permitió la generación de tetrahidro- β -carbolinas con diferente patrón de sustitución en rendimientos moderados.
- La actividad citotóxica de las tetrahidro- β -carbolinas dependió de la configuración en la posición 3; así como del sustituyente en la posición 1.
- La presencia de un sustituyente carboxibenzoilo en N-2 incrementa significativamente la actividad de los compuestos estudiados; sin embargo, disminuye la selectividad en las líneas celulares de cáncer empleadas.
- Nuestros resultados sugieren que la actividad citotóxica de los compuestos no depende de manera absoluta de la planaridad de la molécula.
- Se obtuvo un compuesto (C12), un racemato (C4) y una mezcla diastereoisomérica (C8) con una alta selectividad hacia cáncer de mama (MCF-7).



9. PERSPECTIVAS

En la presente investigación se generó información preliminar de relaciones estructura-actividad citotóxica de una serie de derivados de las tetrahydro- β -carbolinas; sin embargo, será necesario posteriormente:

- La optimización de las condiciones de reacción cuyo rendimiento fue bajo.
- La determinación de la concentración inhibitoria media de los compuestos de mejor perfil farmacológico.
- La generación de más de una molécula plana.
- La resolución de las mezclas diastereoisoméricas activas, con el fin de determinar de forma inequívoca la configuración en la posición 1 del compuesto más activo.
- La resolución o la generación enantioselectiva del enantiómero *S*, posible responsable de la alta selectividad del racemato **C4** a la línea MCF-7.



10. BIBLIOGRAFIA

- Barsanti, P. A., Wang, W., Ni, Z.-J., Duhl, D., Brammeier, N., Martin, E., et al. (2010). The discovery of tetrahydro-b-carbolines as inhibitors of the kinesin Eg5. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, *20*, 157-160.
- Cao, R., Peng, W., Chen, H., Ma, Y., Liu, X., Hou, X., et al. (2005). DNA binding properties of 9-substituted harmine derivatives. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *338*, 1557–1563.
- Chabner, B., & Roberts Jr, T. G. (2005). Perspectives, Chemotherapy and war on cáncer. *Nature Reviews Cáncer*, *5*, 65-71.
- da Rocha, A. B., Lopes, R. M., & Schwartzmann, G. (2001). Natural products in anticancer therapy. *Current Opinion in Pharmacology*, *1*, 364–369.
- Díaz-Rubio, E., & García-Conde, J. (2002). *Oncología Clínica Básica*. España: Arán Ediciones.
- Escobar, L., Rivera, A., & Aristizábal, F. (2010). *Estudio Comparativo de los Métodos de Resazurina y MTT en estudios de citotoxicidad en líneas celulares tumorales humanas*. Recuperado el 4 de Febrero 5 de 2011, de http://www.scielo.unal.edu.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0121-40042010000100009&lng=en&nrm=iso. ISSN 0121-4004.
- Haefner, B. (2002). NF-κB: arresting a major culprit in cancer. *therapeutic focus*, *7* (12), 653-661.
- Hamann, J., Wernicke, C., Lehmann, J., Reichmann, H., Rommelspacher, H., & Gille, G. (2008). 9-Methyl-b-carboline up-regulates the appearance of differentiated dopaminergic neurones in primary mesencephalic culture. *Neurochemistry International*, *52*, 688–700.
- Ibañez. (2004). *cybertesis*. Recuperado el 4 de Febrero de 2011, de http://www.cybertesis.edu.pe/sisbib/2004/ibanez_vl/xhtml/TH.3.xml
- INEGI. (2011). Recuperado el 3 de Febrero de 2011, de www.inegi.gob.mx/inegi/contenidos/.../estadisticas/.../cancer0.doc.
- Ishida, J., Wang, H.-K., Bastow, K. F., Hu, C.-Q., & Lee, K.-H. (1999). Cytotoxicity of harmine and β-carboline analogs. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, *9*, 3319-3324.
- Jenkins, P. R., Wilson, J., Emmerson, D., Garcia, M. D., Smith, M. R., Gray, S. J., et al. (2008). Design, synthesis and biological evaluation of new tryptamine and tetrahydro-b-carboline-based selective inhibitors of CDK4. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, *16*, 7728–7739.

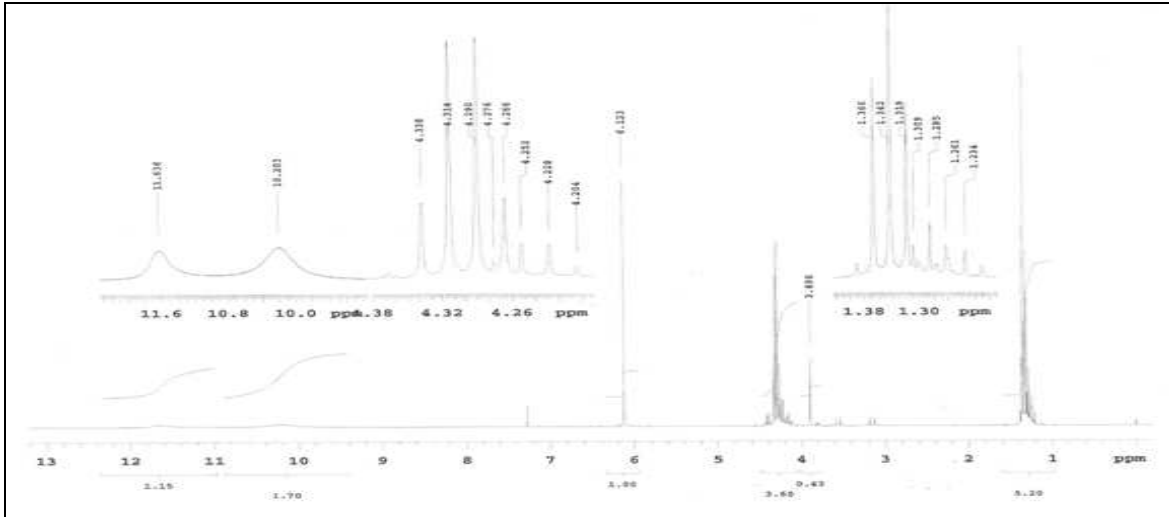


- Jiménez, J., Riverón-Negrete, L., Abdullaev, F., Espinosa-Aguirre, J., & Rodríguez-Arnaiz, R. (2008). Cytotoxicity of the b-carboline alkaloids harmine and harmaline in human cell assays in vitro. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 60, 381–389.
- Kabayashi, J., & Ishibashi, M. (1999). Marine Natural Products and Marine Chemical Ecology. In O. Meth-Cohn, S. D. Barton, & K. Nakanish, *Comprehensive Natural Products Chemistry* (Vol. 8, pp. 524-529). Elsevier Science Ltd.
- Kool, E. T. (1999). Overview. In O. Meth-Cohn, S. D. Barton, & K. Nakanishi, *Comprehensive Natural Products Chemistry* (Vol. 7, pp. 1-13). Elsevier Science Ltd.
- Kürt, L., & Czako, B. (2005). *18. L. Kürt Strategic applications of Named Reactions in Organic Synthesis*. USA: Elsevier.
- Lehnert, E. K., Miller, K. E., Madalengoitia, J. S., Guzi, T., & MacDonald, T. L. (1994). DNA Topoisomerase II Inhibition by Substituted 1,2,3,4-Tetrahydro- β -carboline Derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 4 (20), 2411-2416.
- Li, J. J. (2005). *Name Reactions in Heterocyclic Chemistry*. N. Jersey: John Wiley & Sons. Inc.
- MacDonald, T. L., Labroli, M. A., & Tepe, J. J. (1999). DNA Topoisomerase Inhibitors. In O. Meth-Cohn, S. D. Barto, & K. Nakanishi, *Comprehensive Natural Products Chemistry* (Vol. 7, pp. 594-611). Elsevier Science Ltd.
- MacDonald, T. L., Labroli, M. A., & Tepe, J. J. (1999). DNA Topoisomerase Inhibitors. In O. Meth-Cohn, S. D. Barton, & K. Nakanish, *Comprehensive Natural Products Chemistry* (Vol. 7, pp. 594-611). Elsevier Science Ltd.
- Meester, C. d. (1995). Genotoxic potential of β -carbolines: a review. *Mutation Research*, 339, 139-153.
- Miryam. (2008, Junio 07). *Diario de una científica*. Retrieved Marzo 02, 2011, from http://mylaboratorio.blogspot.com/2008_06_01_archive.html
- Misra, N., Luthra, R., Singh, K. L., & Kumar, S. (1999). Recent Advances in Biosynthesis of Alkaloids. In O. Meth-Cohn, S. D. Barton, & K. Nakanish, *Comprehensive Natural Products Chemistry* (Vol. 4, pp. 46-55). Elsevier Science Ltd.
- Nafisi, S., Bonsaii, M., Maali, P., Khalilzadeh, M. A., & Manouchehri, F. (2010). b-Carboline alkaloids bind DNA. *Journal of Photochemistry and Photobiology*, 52, 84-91.
- Picada, J. N., da Silva, K. V., Erdtmann, B., Henriques, A. T., & Henriques, J. A. (1997). Genotoxic effects of structurally related b-carboline alkaloids. *Mutation Research*, 379, 135–149.
- Pulka, K., & Misicka, A. (2011). Influence of reaction conditions on products of the Pictet-Spengler condensation. *Tetrahedron*, 67, 1955-1959.

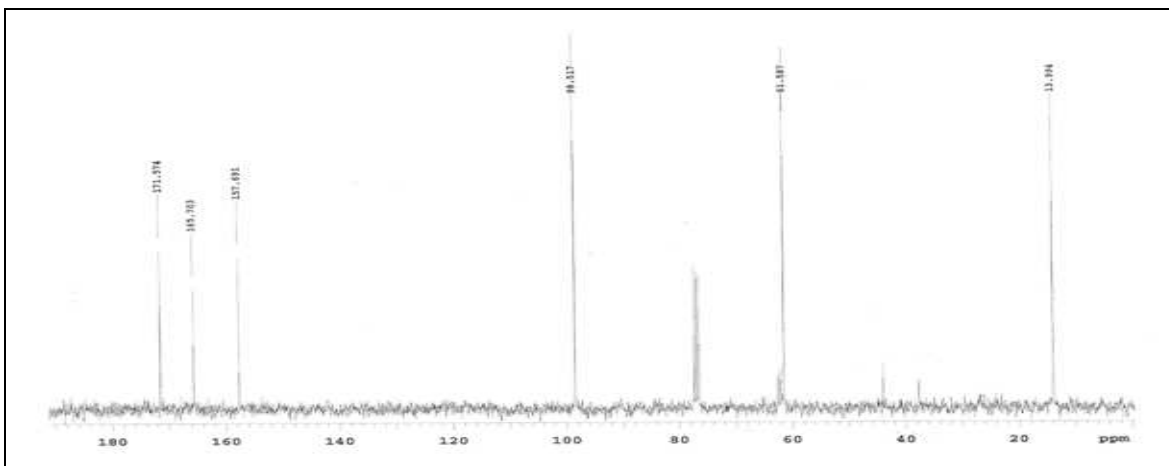


- Rubin, P. (2003). *Enfoque multidisciplinario para médicos y estudiantes*. España: Elsevier.
- Santos, L. S., Theoduloz, C., Pilli, R. A., & Rodriguez, J. (2009). Antiproliferative activity of arborescidine alkaloids and derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry*, *44*, 3810–3815.
- Schmid, J. A., & Birbach, A. (2008). IκB kinase b (IKKb/IKK2/IKBKB)—A key molecule in signaling to the transcription factor NF-κB. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, *19*, 157-165.
- Song, Y., Kesuma, D., Wang, J., Deng, Y., Duan, J., Wang, J. H., et al. (2004). Specific inhibition of cyclin-dependent kinases and cell proliferation by harmine. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *317*, 28–132.
- Song, Y., Wang, J., Teng, S. F., Kesuma, D., Deng, Y., Duan, J., et al. (2002). b-Carbolines as Specific Inhibitors of Cyclin-Dependent Kinases. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, *12*, 1129–1132.
- Sunder-Plassmann, N., Sarli, V., Gartner, M., Utz, M., Seiler, J., Huemmer, S., et al. (2005). Synthesis and biological evaluation of new tetrahydro-b-carbolines as inhibitors of the mitotic kinesin Eg5. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, *13*, 6094–6111.
- Tse, W. C., & Boger, D. L. (2003). Sequence-Selective DNA Recognition: Natural Products and Nature's Lessons. *Chemistry & Biology*, *11*, 1607–1617.
- WHO. (2011). Recuperado el 3 de Febrero de 2011, de <http://www.who.int/cancer/en/>
- Wu, J., Zhao, M., Qian, K., Lee, K.-H., Morris-Natschke, S., & Peng, S. (2009). Novel N-(3-carboxyl-9-benzyl-b-carboline-1-yl)ethylamino acids: Synthesis, anti-tumor evaluation, intercalating determination, 3D QSAR analysis and docking investigation. *European Journal of Medicinal Chemistry*, *44*, 4153–4161.
- Wu, Q., Cao, R., Feng, M., Guan, X., Ma, C., Liu, J., et al. (2009 b). Synthesis and in vitro cytotoxic evaluation of novel 3,4,5-trimethoxyphenyl substituted b-carboline derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry*, *44*, 533-540.
- Zhao, M., Bi, L., Wang, W., & Wang, C. (2006). Synthesis and cytotoxic activities of b-carboline amino acid ester conjugates. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, *14*, 6998–7010.

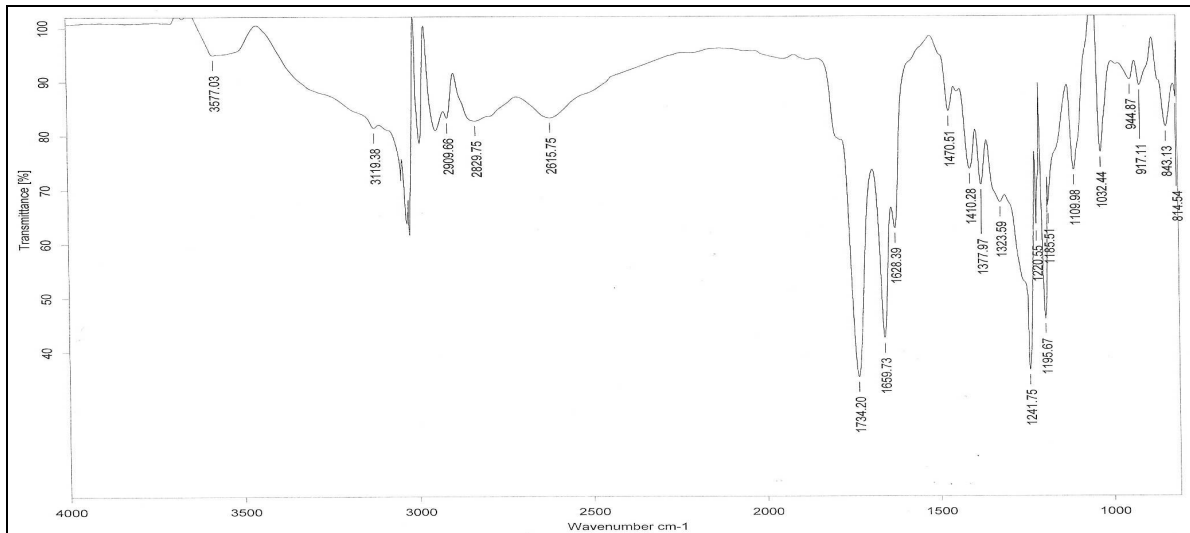
11. ANEXOS



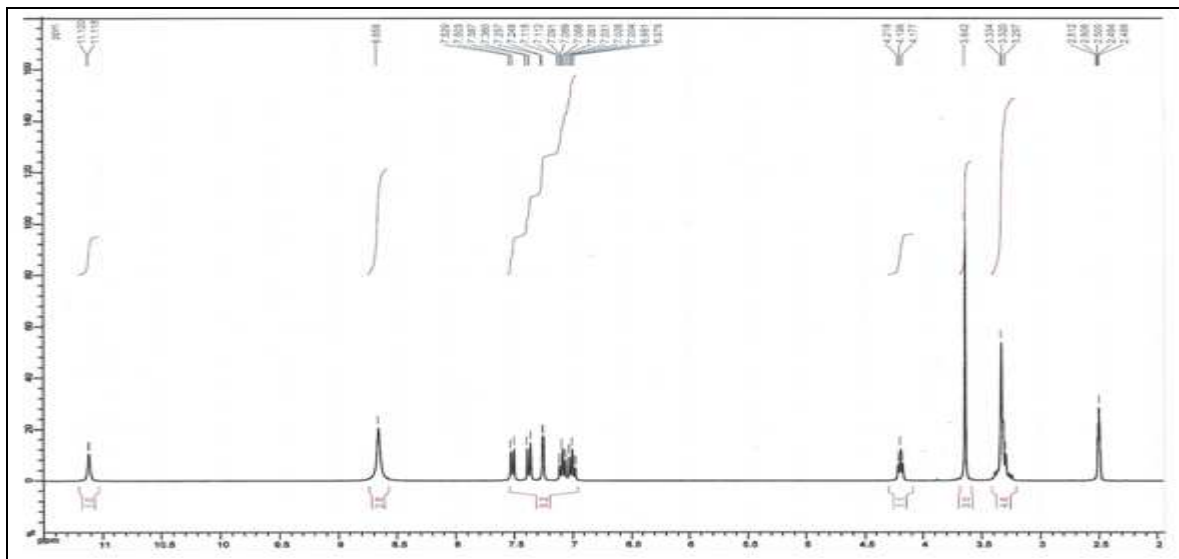
Espectro de RMN^1H (300MHz, CDCl_3) del ácido carboxipirúvico.



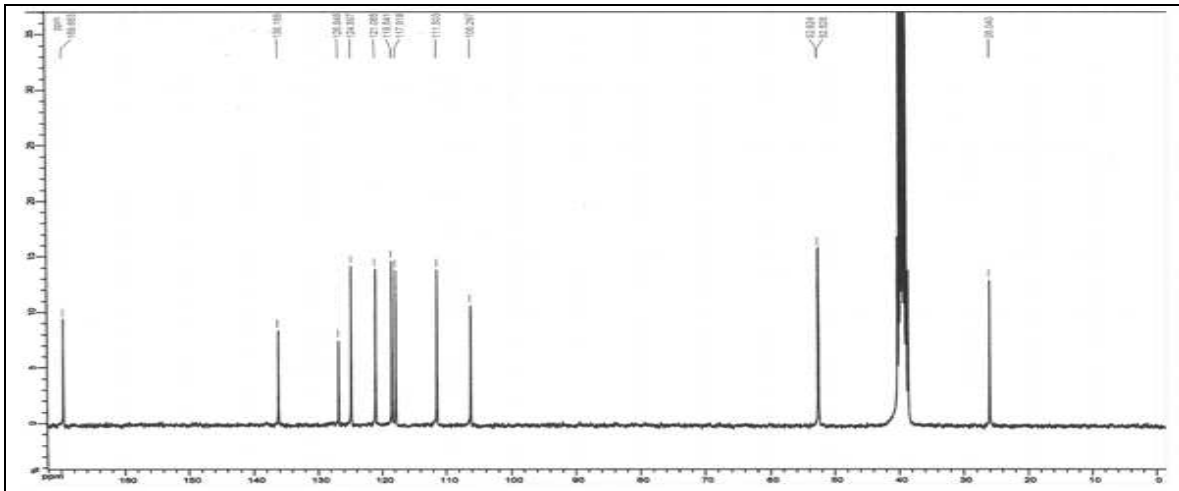
Espectro de RMN^{13}C (75MHz, CDCl_3) del ácido carboxipirúvico.



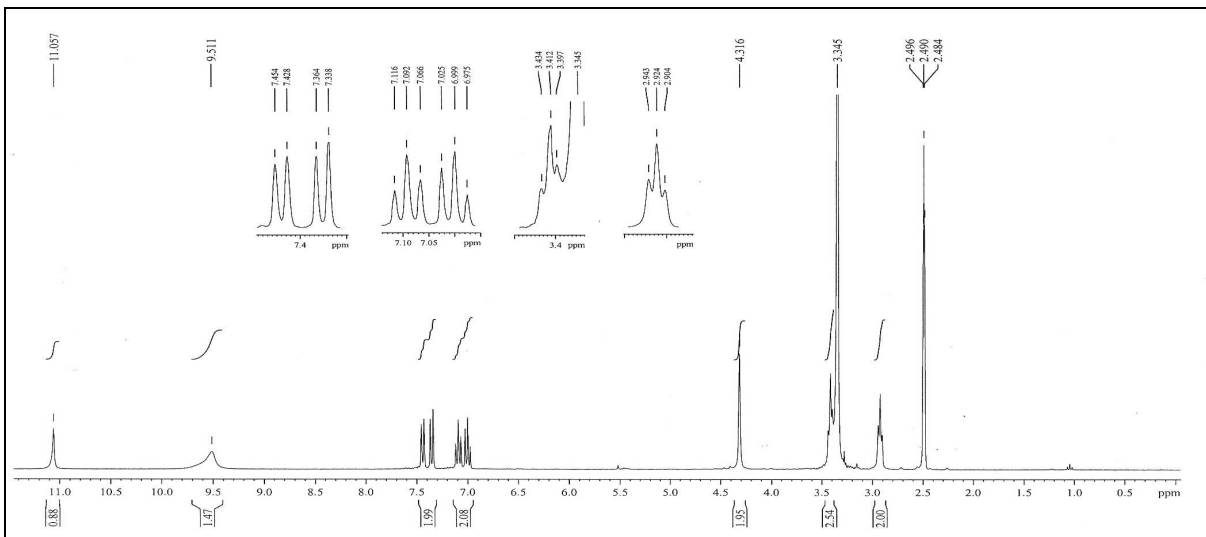
Espectro de IR (CHCl_3) del ácido carboxipirúvico.



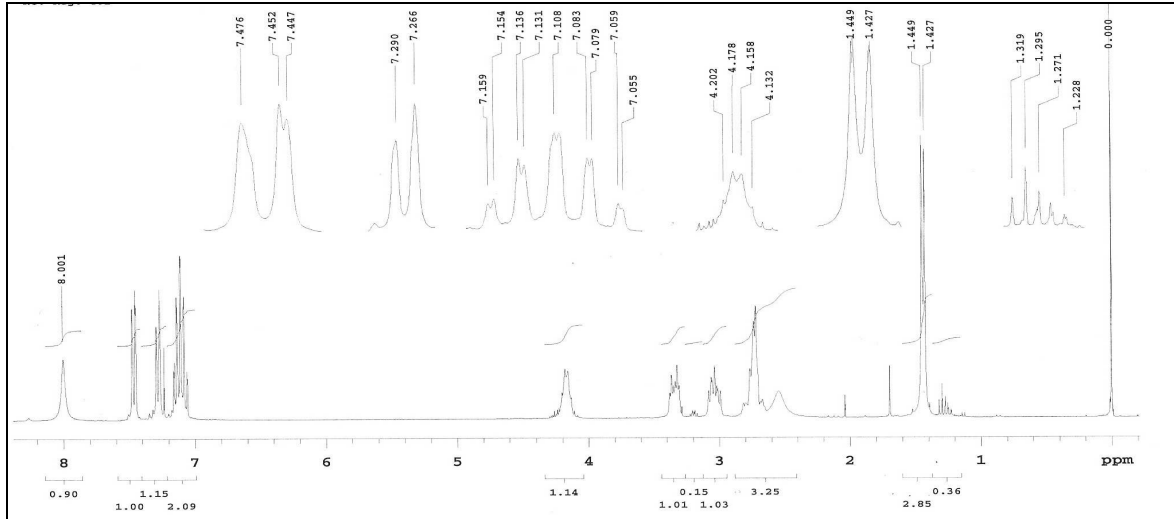
Espectro de RMN¹H (300MHz, DMSO-d_6) de C-A.



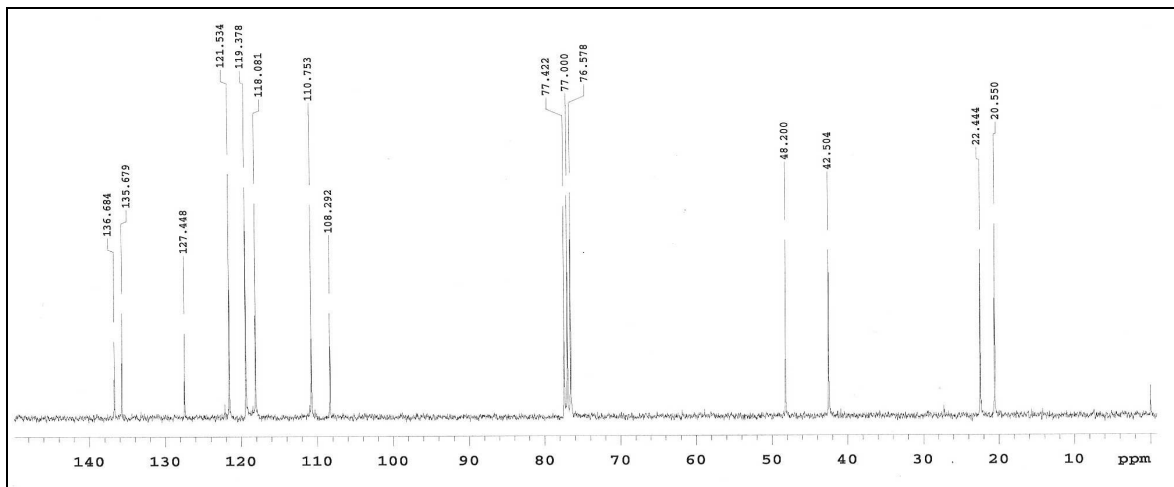
Espectro de RMN¹³C (75MHz, DMSO-d₆) de C-A.



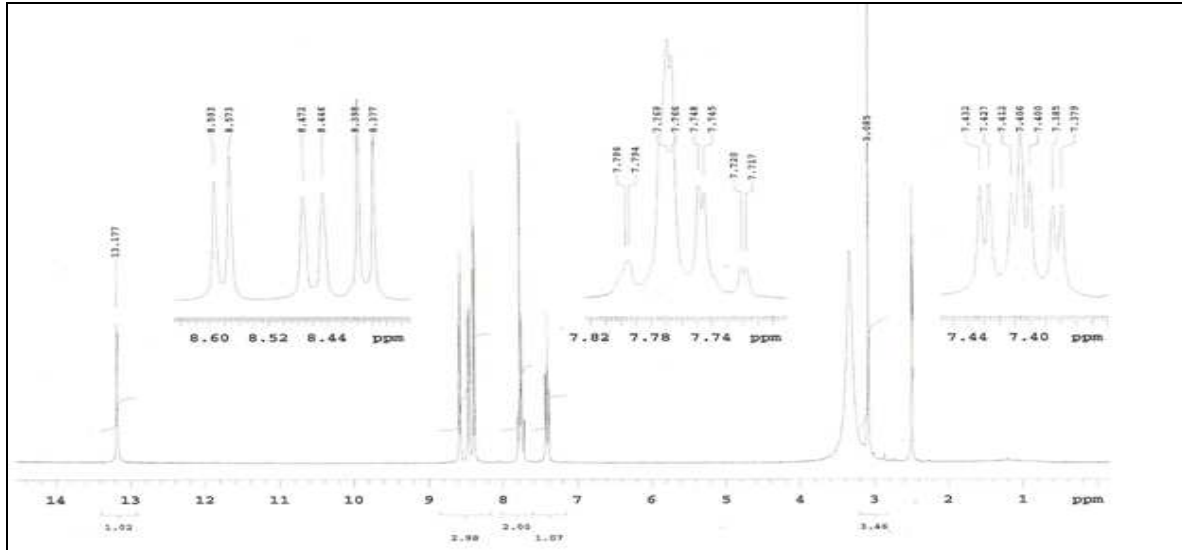
Espectro de RMN¹H (300MHz, DMSO-d₆) de C1.



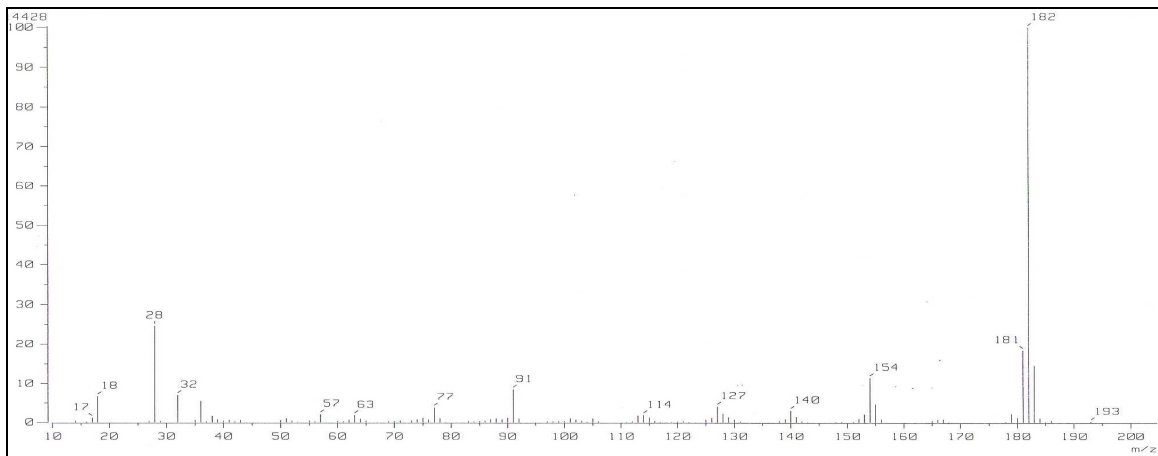
Espectro de RMN¹H (300MHz, CDCl₃) de C2.



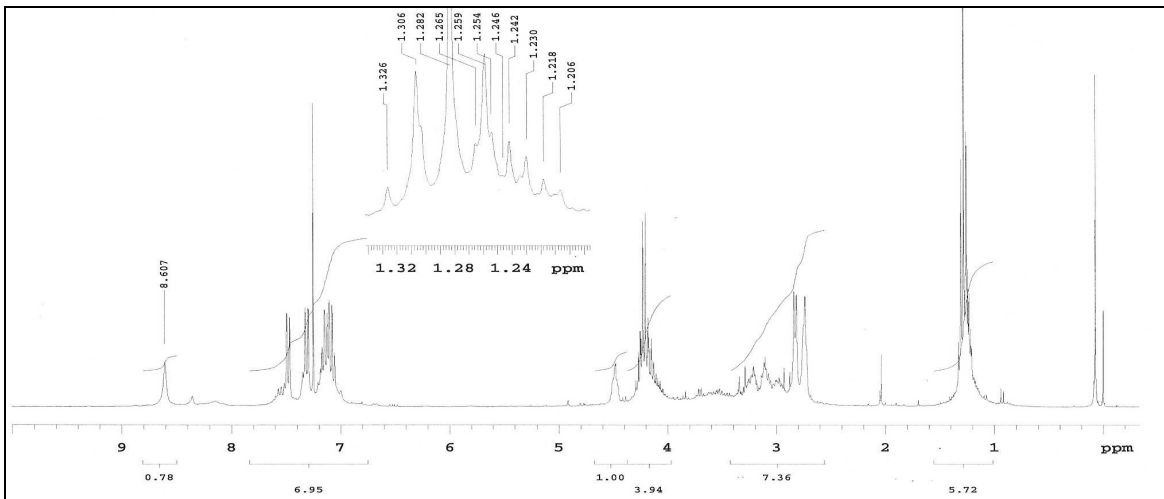
Espectro de RMN¹³C (75MHz, CDCl₃) de C2.



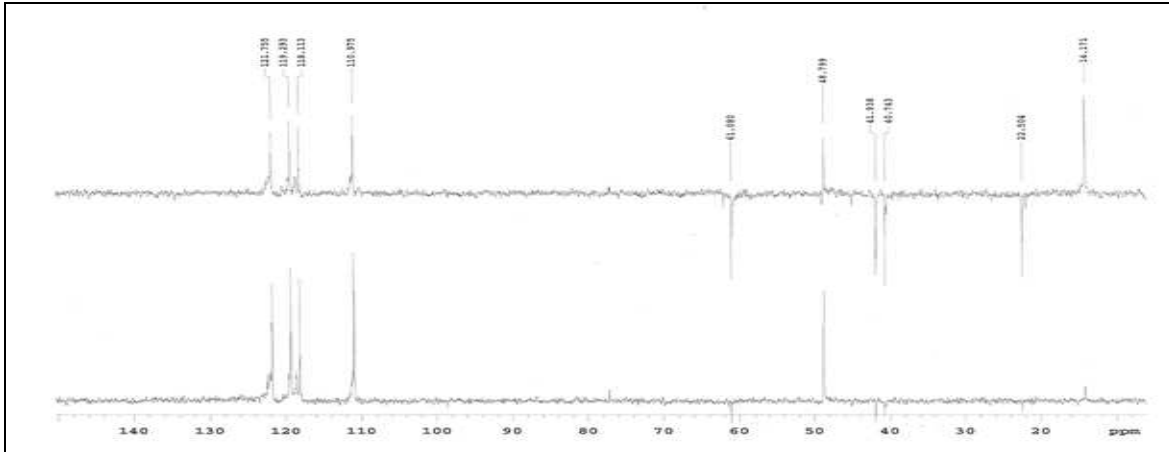
Espectro de RMN¹H (300MHz, DMSO-d₆) de C3.



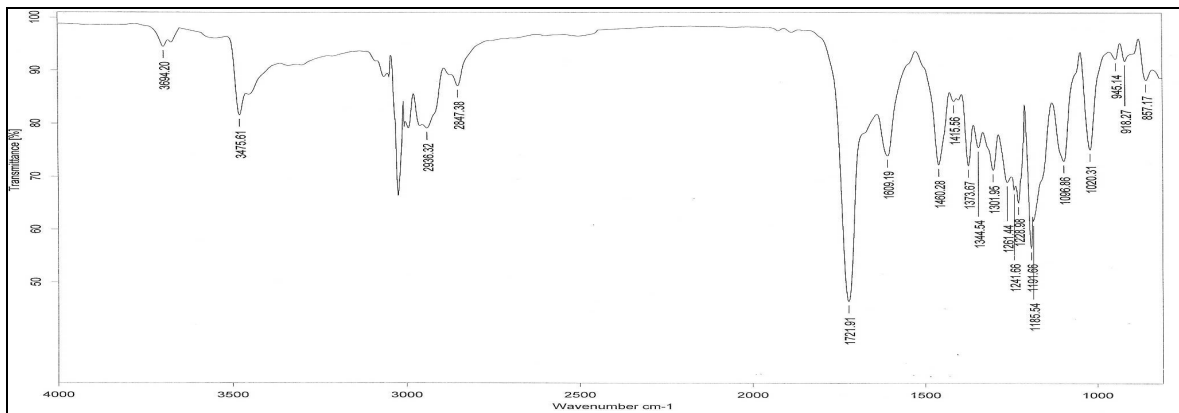
Espectro de masas (IE) de C3.



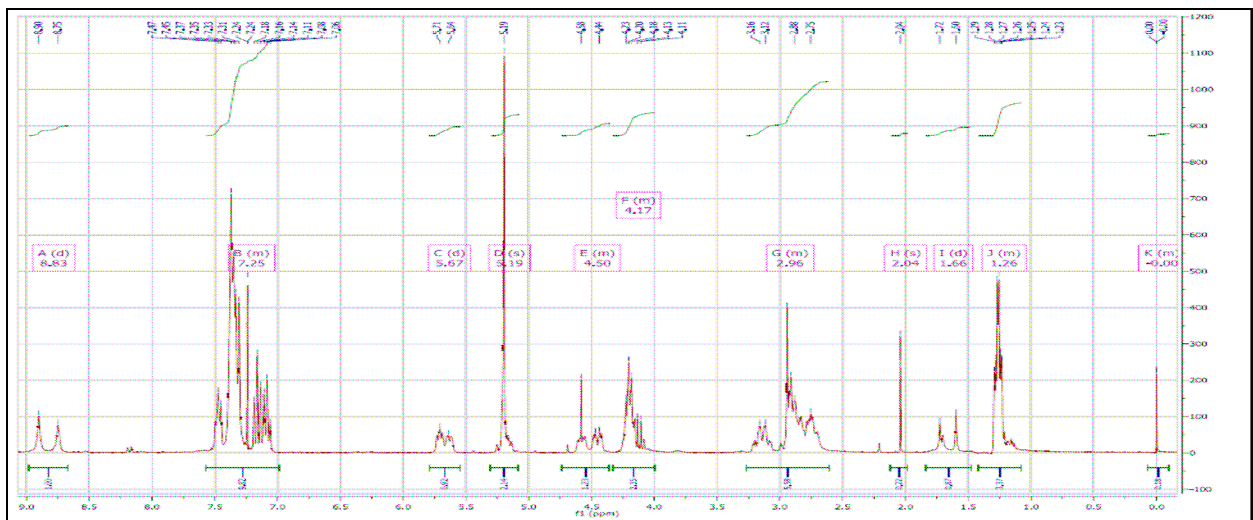
Espectro de RMN¹H (300MHz, CDCl₃) de C4.



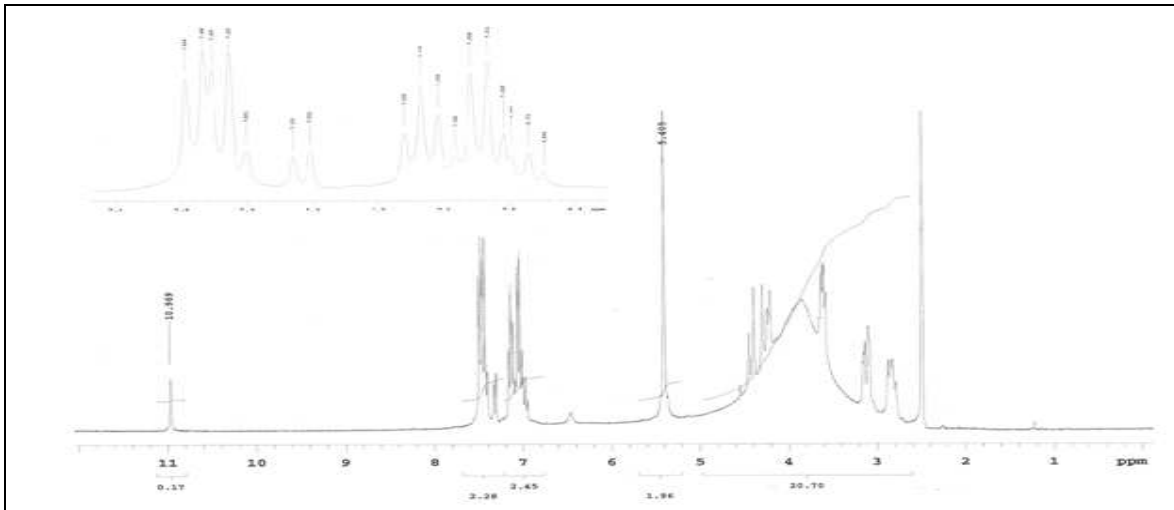
Espectro de RMN¹³C (75MHz, CDCl₃) de C4.



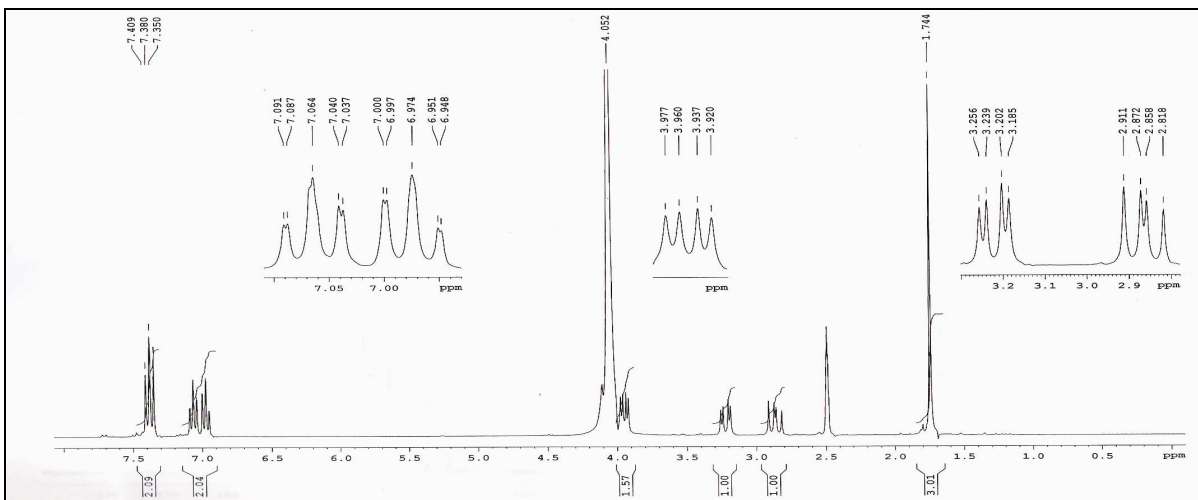
Espectro de IR(KBr) de C4.



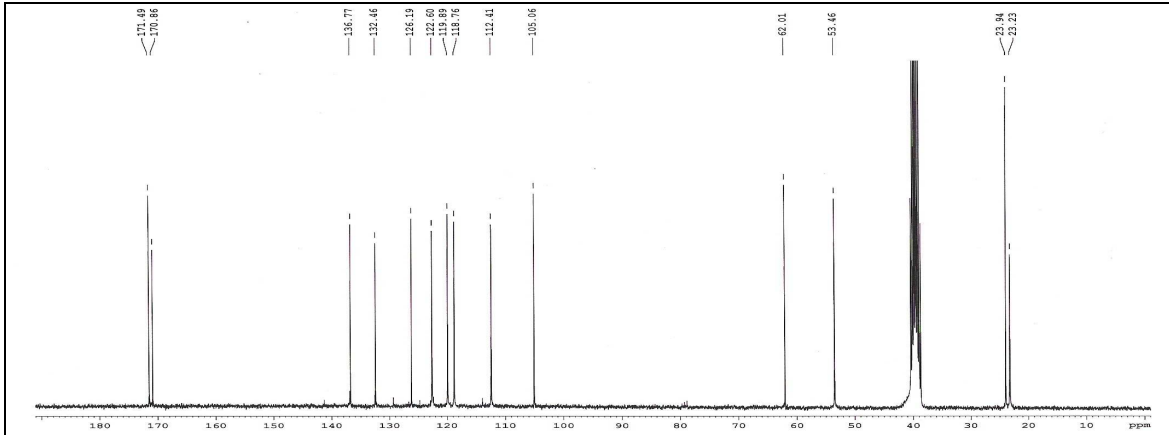
Espectro de RMN¹H (300MHz, CDCl₃) de C5.



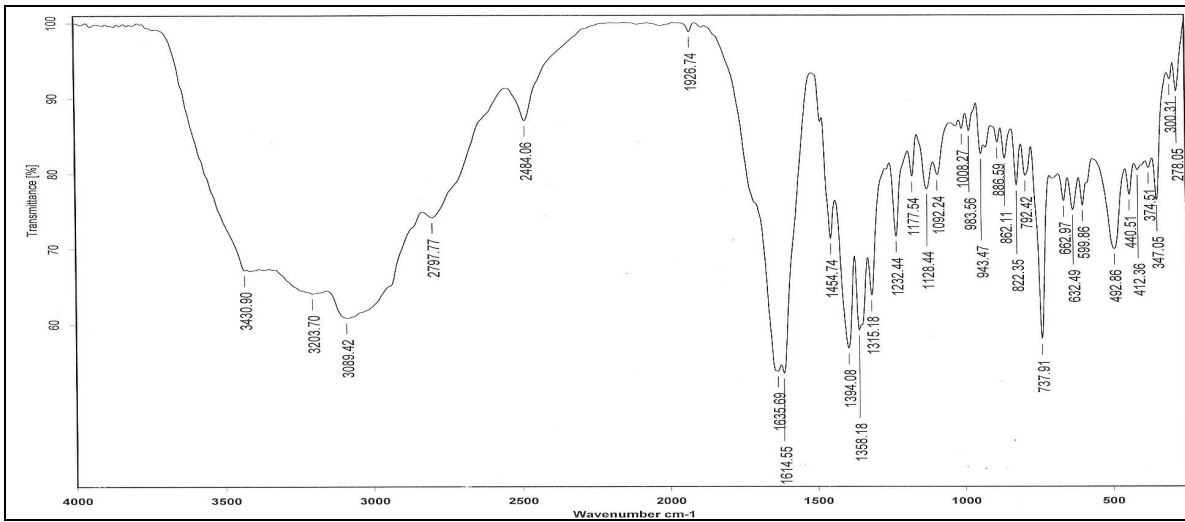
Espectro de RMN¹H (300MHz, DMSO-*d*₆) de C6.



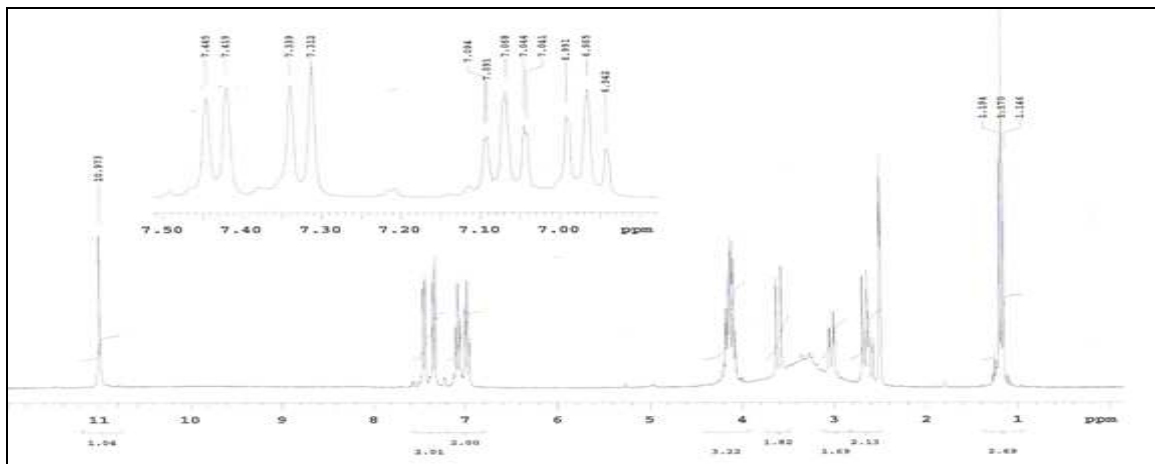
Espectro de RMN¹H (300MHz, DMSO-*d*₆ +D₂O) de C7.



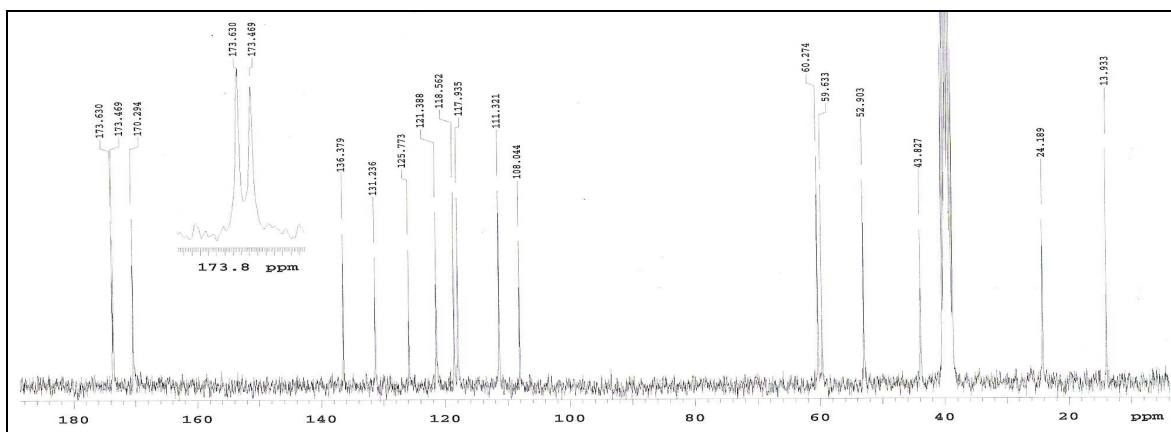
Espectro de RMN¹H (75MHz, DMSO-*d*₆ + D₂O) de C7.



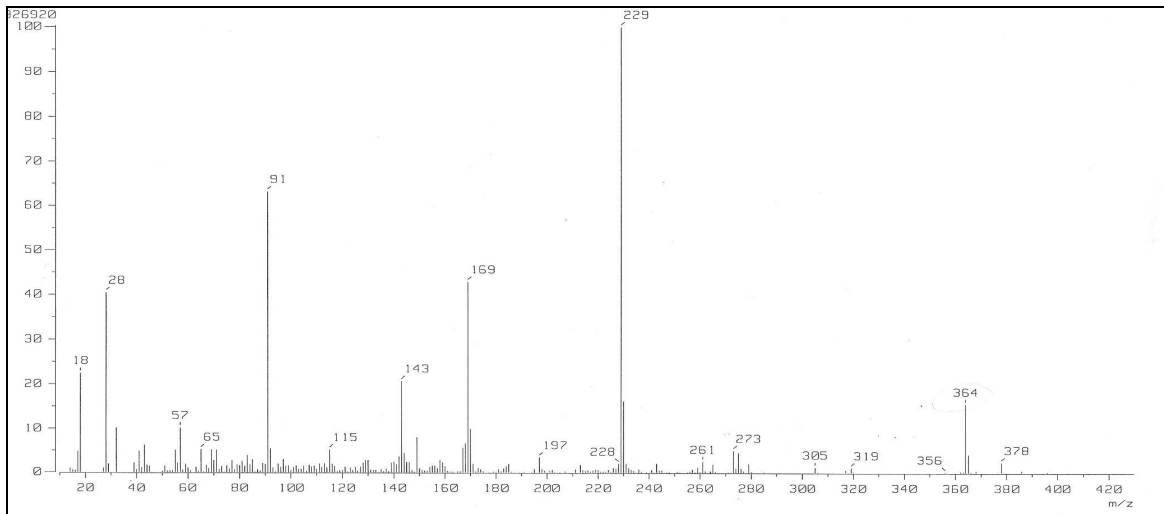
Espectro de IR (KBr) de C7.



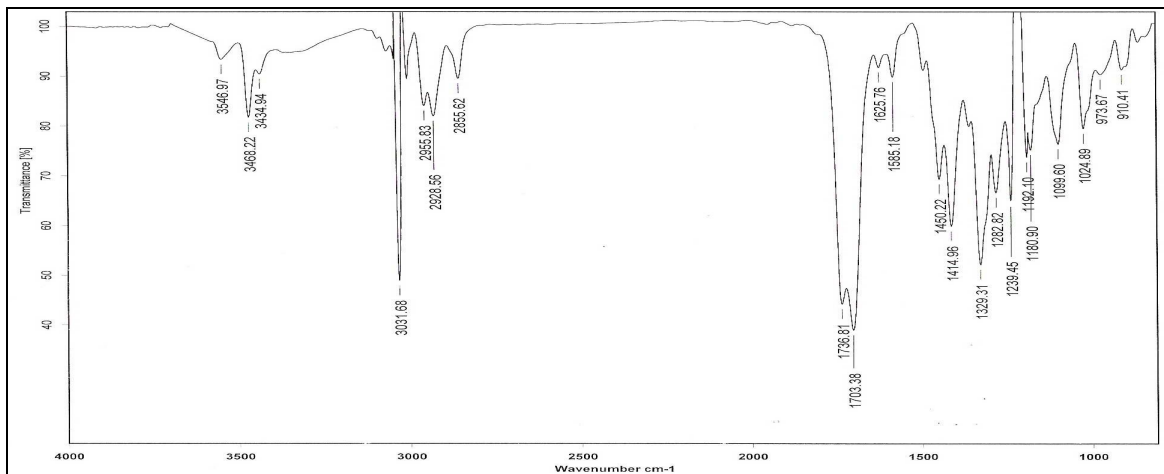
Espectro de RMN^1H (300MHz, $\text{DMSO-}d_6$) de C8.



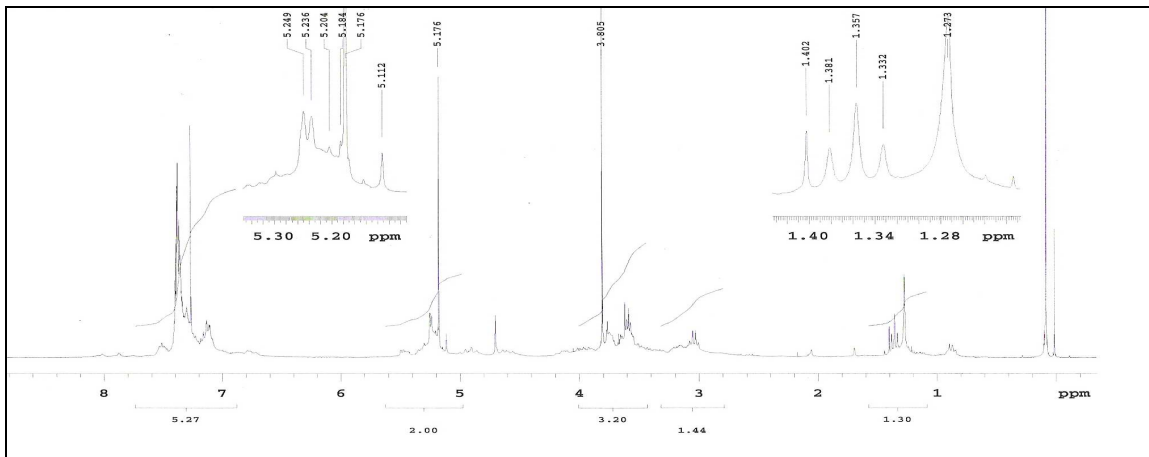
Espectro de RMN^{13}C (75MHz, $\text{DMSO-}d_6$) de C8.



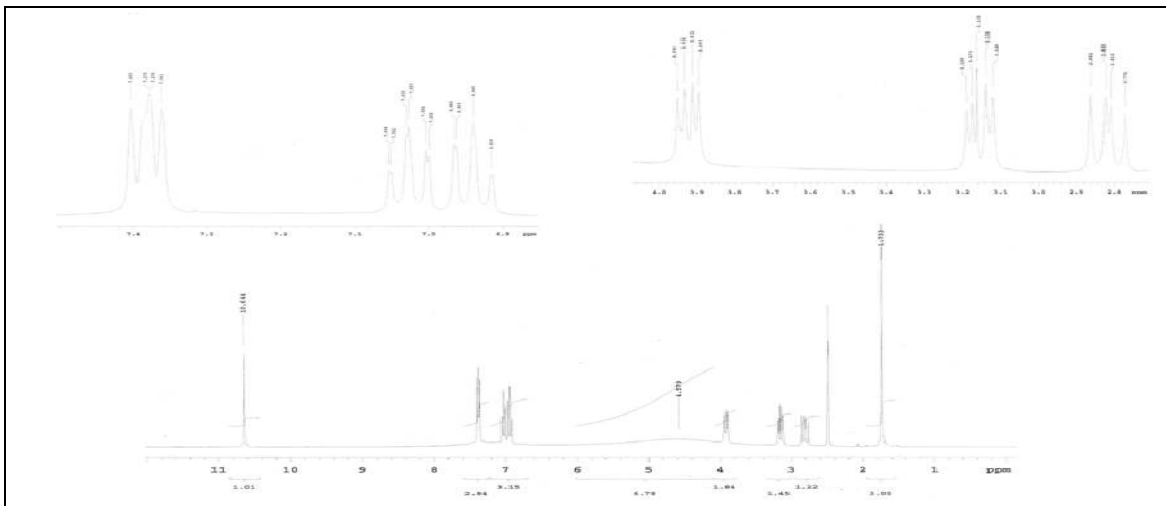
Espectro de Masas (IE) de C11.



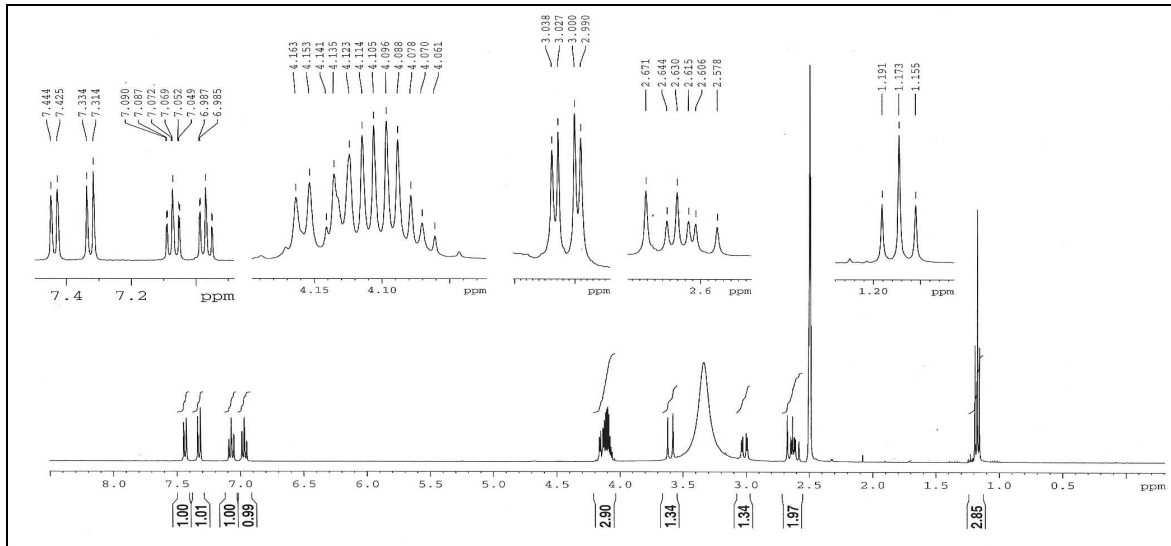
Espectro de IR (CHCl₃) de C11.



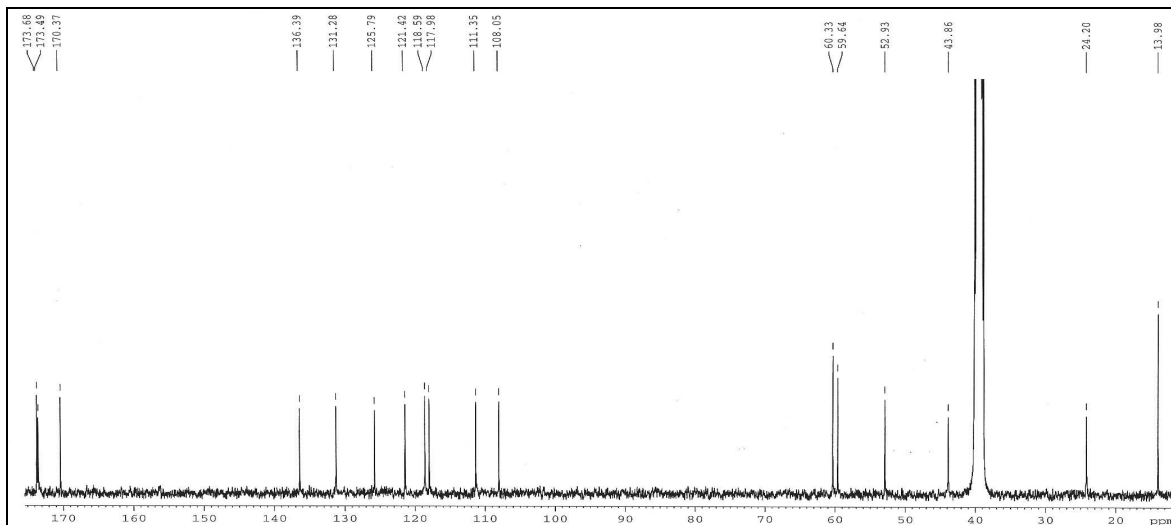
Espectro de RMN¹H (300MHz, CDCl₃) de C11.



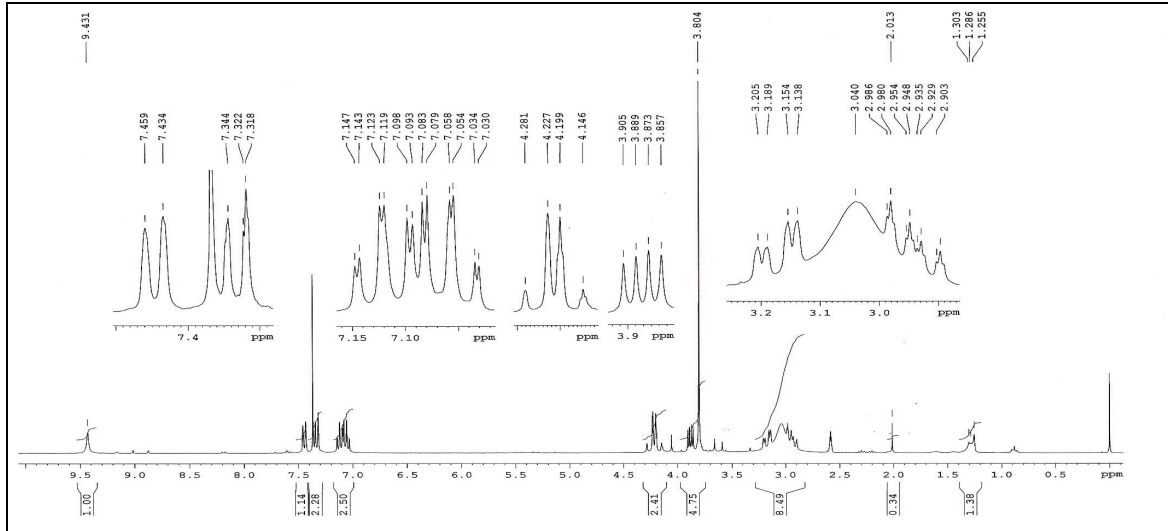
Espectro de RMN¹H (300MHz, DMSO-*d*₆) de C13.



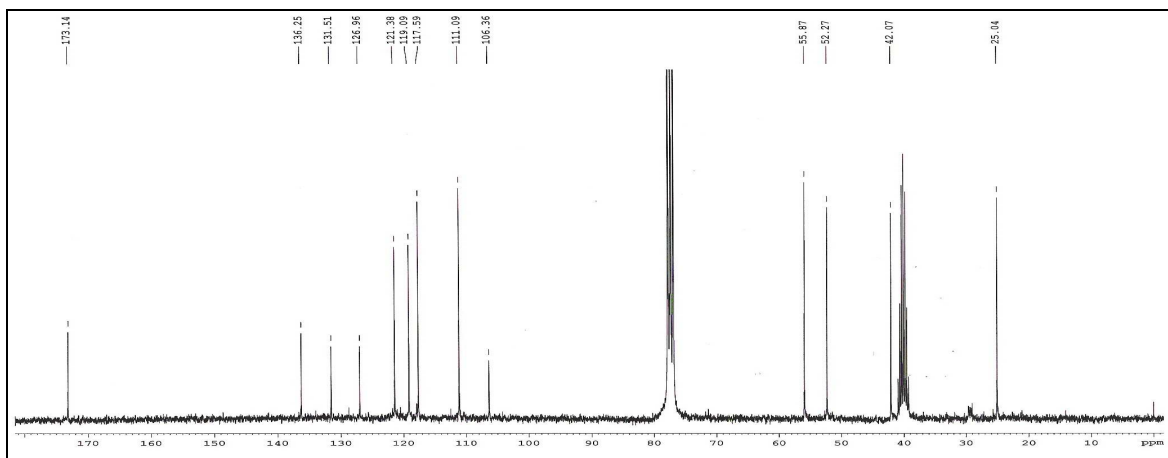
Espectro de RMN¹H (400MHz, DMSO-*d*₆) de C14.



Espectro de RMN¹³C (100MHz, DMSO-*d*₆) de C14.



Espectro de RMN¹H (300MHz, CDCl₃ + DMSO-*d*₆) de C15.



Espectro de RMN¹³C (300MHz, CDCl₃ + DMSO-*d*₆) de C15.