



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**SÍNTESIS Y EVALUACIÓN DE DERIVADOS DE QUINAZOLINA CON
POTENCIAL ACTIVIDAD ANTITUMORAL**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA FARMACÉUTICO BIOLÓGICA

PRESENTA

NICOLE NADINE TRUJILLO MINERO



CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX

2017



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE: **Profesor:** FRANCISCO HERNÁNDEZ LUIS
VOCAL: **Profesor:** ELENA GUADALUPE RAMIREZ LÓPEZ
SECRETARIO: **Profesor:** PEDRO JOSUÉ SOTO TREJO
1er. SUPLENTE: **Profesor:** JUAN MANUEL GERMÁN ACACIO
2º SUPLENTE: **Profesor:** LUCERO GONZÁLEZ SEBASTIÁN

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

LABORATORIO 121 DEL CONJUNTO E, DEPARTAMENTO DE FARMACIA,
FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM

ASESOR DEL TEMA:

DR. FRANCISCO HERNÁNDEZ LUIS

SUSTENTANTE:

NICOLE NADINE TRUJILLO MINERO

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

Expreso mi agradecimiento a las siguientes instituciones por el apoyo recibido:

A la **Universidad Nacional Autónoma de México** de la que me siento orgullosa de pertenecer. Gracias a todos mis profesores por su tiempo, sus enseñanzas y su dedicación a la formación de profesionales de la química.

A los miembros del jurado por las valiosas aportaciones al presente trabajo. Gracias por su tiempo y dedicación a la mejora de mi informe.

Expreso mi agradecimiento a la Dirección General del Personal Académico UNAM por el apoyo proporcionado en la compra de materiales de vidriería y sustancias químicas dentro del proyecto **UNAM-DGAPA-PAPIIT IN218117**.

Al Subprograma 127 Formación Básica en Investigación de la Facultad de Química, UNAM por la distinción que me otorgaron durante el ciclo 2016-2017.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo proporcionado en la compra de reactivos de importación para la realización de los experimentos realizados en este trabajo con el proyecto **CB-CONACyT 220664**.

A la Facultad de Química por el apoyo otorgado para el financiamiento de los ensayos in vitro en líneas celulares y pago del registro de espectros de RMN e IR, dentro del programa **PAIP 5000 9136**.

A la Unidad de Servicios Analíticos (USAI) de la Facultad de Química UNAM y a su personal que realizó el registro de los espectros de Resonancia Magnética Nuclear (Rosa Isela del Villar Morales, Nayeli López Balbiaux), Espectroscopia de Infrarrojo (Marisela Patricia Gutiérrez Franco).

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

En primer lugar, quiero agradecer al Dr. Francisco Hernández Luis por abrirme las puertas del laboratorio 121, por su confianza, sus consejos, enseñanzas y el apoyo incondicional que me brindó no sólo durante el desarrollo de esta tesis sino también a lo largo del servicio social y estancia estudiantil.

Gracias a la familia en la que nací: Mi papá por el amor y apoyo que siempre me ha brindado a su manera, a mi mamá que sabe que la culminación de mis estudios de licenciatura no es solo resultado de 5 años de trabajo y esfuerzo, sino de 23 años que ha estado presente en cada momento dándome ánimos, consejos y amándome como solo ella sabe, a mi hermano menor por sus ánimos y amor incondicional, es un honor ser tu hermana y una bendición que sigas con nosotros.

Gracias a Ricardo Negrete López, por llegar para quedarse y tú sabes TODO lo demás.

Gracias a la familia que me encontré en el camino: Ani, Lalo, Will y Hernán, no pude hallar mejores amigos que ustedes, gracias por ser mi squad, por su cariño y cada momento vivido a lo largo de estos 5 años, por estar ahí desde el inicio y seguir.

Gracias al Dr. Alfonso Lira Rocha por los consejos, los ánimos y por ayudarme a practicar francés durante mi estancia en el laboratorio 121.

También me gustaría agradecer a mis compañeros y ex compañeros del laboratorio 121: Sol, Bárbara, Frida, Karina, Itzel, Audifas y Víctor.

A la Dra. Elena Ramírez López por sus aportaciones y sugerencias para la mejora de esta tesis y por su apoyo en cada trámite necesario.

Al Dr. Pedro Josué Soto Trejo por todas sus enseñanzas, su ayuda y por siempre escuchar.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ÍNDICE DE FIRUGAS Y ESQUEMAS

ÍNDICE DE TABLAS

1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1. Aspectos básicos sobre el cáncer.....	3
2.2. Etapas de carcinogénesis	4
2.3. Cambios celulares y fenotipo maligno.....	5
2.4. Causas de cáncer	6
2.4.1 Alteraciones genéticas.....	7
2.4.2 Carcinógenos	8
2.5. Tipos de cáncer.....	10
2.6. Metástasis.....	11
2.7. Generalidades del cáncer de mama.....	13
2.7.1. Tipos de cáncer de mama.....	14
2.8. Estadísticas en México y en el mundo	15
2.8.1. Incidencia y muertes por cáncer en el mundo	16
2.8.2. Mortalidad y morbilidad en México	17
2.8.3. Incidencia y mortalidad por cáncer de mama a nivel mundial.....	19
2.8.4. Incidencia y mortalidad por cáncer de mama en México	19
2.9. Tratamiento de cáncer	20
2.9.1. Cirugía.....	20
2.9.2. Radioterapia	21
2.9.3. Quimioterapia.....	22
2.9.3.1. Clasificación de agentes quimioterapéuticos.....	23
2.9.4. Tratamiento de cáncer de mama	24
2.9.4.1. Receptor de estrógeno como posible blanco terapéutico.....	27
2.9.4.2. Derivados de quinazolininas como opción terapéutica	28
2.9.5. Acoplamiento molecular	29
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	31
4. HIPÓTESIS.....	31
5. OBJETIVOS.....	33
5.1. Objetivo general.....	33

5.2. Objetivos particulares.....	33
6. METODOLOGÍA.....	33
6.1. Estudio de acoplamiento molecular (docking) de compuestos NICQ1-NICQ5	33
6.1.1. Preparación de la proteína (molécula receptora).....	33
6.1.2. Preparación de la molécula ligando	33
6.1.3. Docking molecular	34
6.2. Síntesis química de derivados de quinazolina	34
6.2.1 Síntesis de derivados de quinazolin-2,4,6-triamina sustituidos con benzamidas en posición 6	34
6.2.1.1 Síntesis de 3-(acetilamino)-N-(2,4-diaminoquinazolin-6-il)benzamida (NICQ1) y N-(2,4-diaminoquinazolin-6-il)-3-(trifluorometoxi)benzamida (NICQ2)	34
6.2.2. Síntesis de derivados de 6-nitroquinazolin-2,4-diamina sustituidos con benzamidas en posición 2 ó 4	35
6.2.2.1. Síntesis de 3-(acetilamino)-N-(2-amino-6-nitroquinazolin-4-il)benzamida (NICQ3), 3-acetilamino-N-(4-amino-6-nitroquinazolin-2-il)benzamida (NICQ4), y de N-(2-amino-6-nitroquinazolin-4-il)-3-metoxibenzamida (NICQ5)	35
6.3. Evaluación biológica de los compuestos NICQ1-NICQ5	37
6.3.1. Preparación de líneas celulares.....	37
6.3.2. Preparación del screening primario (escrutinio primario).....	37
6.3.3. Teñido celular.....	38
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	38
7.1. Estudios de acoplamiento molecular de los compuestos NICQ1-NICQ5.....	38
7.2. Síntesis y caracterización de derivados de quinazolina	43
7.2.1. Síntesis y caracterización del compuesto 3-(acetilamino)-N-(2,4-diaminoquinazolin-6-il)benzamida (NICQ1)	47
7.2.2. Síntesis y caracterización del compuesto N-(2,4-diaminoquinazolin-6-il)-3-(trifluorometoxi)benzamida (NICQ2).....	50
7.2.3. Síntesis y caracterización de 3-(acetilamino)-N-(2-amino-6-nitroquinazolin-4-il)benzamida (NICQ3)	52
7.2.4. Síntesis y caracterización de 3-acetilamino-N-(4-amino-6-nitroquinazolin-2-il)benzamida (NICQ4)	54
7.2.5. Síntesis y caracterización de N-(2-amino-6-nitroquinazolin-4-il)-3-metoxibenzamida (NICQ5).....	57
7.3. Evaluación de la actividad biológica	58
8. CONCLUSIONES	63
9. PERSPECTIVAS.....	65
10. REFERENCIAS.....	66

APÉNDICE I. PARTE EXPERIMENTAL

APÉNDICE II. ESPECTROS DE IR Y RMN- ^1H

APÉNDICE III. ACOPLAMIENTOS MOLECULARES

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

Å	Angstrom
Brca1	Gen de susceptibilidad para cáncer de mama 1
Brca 2	Gen de susceptibilidad para cáncer de mama 1
CDI	1-1'-carbonildiimidazol
DCIS	Carcinoma ductal <i>in situ</i>
DMF	dimetilformamida
DMSO	dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
E₂	Estradiol
EM	Espectrometría de masas
ER	Receptor estrogénico
ER⁺	Receptor estrogénico positivo
ERα	Receptor estrogénico alfa
ERβ	Receptor estrogénico beta
FGH	Fibroblastos gingivales humanos
HAP	Hidrocarburos aromáticos policíclicos
HER-2	Factor 2 de crecimiento epidérmico
HER-2⁺	Factor 2 de crecimiento epidérmico positivo
HR	Receptores hormonales
IARC	Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer
IR	Infrarrojo
LCIS	Carcinoma lobular <i>in situ</i>
MTT	bromuro de 3-(3,5-dimetil-2-triazolil)-2,5-difeniltetrazolio
N.d.	No determinado
OMS	Organización Mundial de la Salud
P.d.	Punto de descomposición
P.f.	Punto de fusión
PDB	Protein Data Bank
PR⁺	Receptor de progesterona positivo

PyBOP	hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-oxitripirrolidinfosfonio
R.f.	Factor de retención
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SRB	sulforrodamina B
TEA	triethylamina
UV	Ultravioleta
%IC	% de inhibición del crecimiento

ÍNDICE DE FIGURAS Y ESQUEMAS

Figura 1. Crecimiento de células cancerosas en tejido normal

Figura 2. Etapas de carcinogénesis

Figura 3. Alteraciones fisiológicas en células debido al cáncer.

Figura 4. Mecanismos genotóxicos y no genotóxicos de carcinógenos químicos

Figura 5. Inicio de metástasis

Figura 6. Etapas de carcinogénesis desde células normales hasta conversión a células malignas con habilidad metastásica en relación con la acumulación de mutaciones

Figura 7. Las cinco etapas de la cascada metastásica

Figura 8. Anatomía de mamas

Figura 9. Incidencia de los más frecuentes tipos de cáncer en el mundo durante el 2012

Figura 10. Número de muertes causadas por los más frecuentes tipos de cáncer en el mundo durante el 2012

Figura 11. Tasa de mortalidad por cáncer en México durante el 2013 en población mayor a 20 años

Figura 12. Datos estadísticos referentes al cáncer de mama en México durante el 2014

Figura 13. Mecanismos directo e indirecto por los que la radiación causa alteraciones en el material genético de las células

Figura 14. Visualización de las interacciones del compuesto **NICQ1** con el dominio de unión a ligando del receptor estrogénico alfa humano (ER- α) y estructura 2D del compuesto **NICQ1**.

Figura 15. Visualización de las interacciones del compuesto **NICQ2** con el dominio de unión a ligando del receptor estrogénico alfa humano (ER- α) y estructura 2D del compuesto **NICQ2**.

Figura 16. Visualización de las interacciones del compuesto **NICQ3** con el dominio de unión a ligando del receptor estrogénico alfa humano (ER- α) y estructura 2D del compuesto **NICQ3**.

Figura 17. Visualización de las interacciones del compuesto **NICQ4** con el dominio de unión a ligando del receptor estrogénico alfa humano (ER- α) y la estructura 2D del compuesto **NICQ4**.

Figura 18. Visualización de las interacciones del compuesto **NICQ5** con el dominio de unión a ligando del receptor estrogénico alfa humano (ER- α) y estructura 2D del compuesto **NICQ5**.

Figura 19. Visualización del acoplamiento molecular de un derivado de quinazolina sustituido en 6 con una benzamida sin sustituyente en 3 que fue previamente sintetizado y con actividad citotóxica reportada con el receptor estrogénico alfa humano (ER- α).

Figura 20. Ampliación de la región aromática del espectro de RMN- ^1H del compuesto **NICQ1**

Figura 21. Ampliación de la región aromática del espectro de RMN- ^1H del compuesto **NICQ2**

Figura 22. Ampliación de la región aromática del espectro de RMN- ^1H del compuesto **NICQ3**

Figura 23. Ampliación de la región aromática del espectro de RMN- ^1H del compuesto **NICQ4**

Figura 24. Ampliación de la región aromática del espectro de RMN- ^1H del compuesto **NICQ5**

Esquema 1. Ruta sintética para los compuestos **NICQ1** y **NICQ2**.

Esquema 2. Ruta sintética para los compuestos **NICQ3** y **NICQ4**.

Esquema 3. Ruta sintética para el compuesto **NICQ5**.

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla1. Ejemplos de carcinógenos humanos.

Tabla2. Sub-clasificación de agentes que interactúan con DNA.

Tabla3. Tipos de agentes empleados en terapia hormonal.

Tabla4. Resultados de la evaluación de la actividad citotóxica de derivados de quinazolina sintetizados por el grupo de investigación.

Tabla5. Datos de energía libre de unión y posibles interacciones de cada compuesto con el ER- α obtenidos de los acoplamientos.

Tabla6. Características generales de intermediarios y compuestos finales sintetizados.

Tabla7. Estructura de los compuestos sintetizados y datos espectroscópicos obtenidos de IR y RMN- ^1H .

Tabla 8. Porcentaje de inhibición de crecimiento de las cinco líneas celulares evaluadas en presencia de los compuestos **NICQ2**, **NICQ3** y **NICQ5** a 50 μM .

1. INTRODUCCIÓN

La palabra cáncer denota a un grupo de enfermedades que tienen en común el crecimiento y división descontrolada de las células debido a la falla en algún mecanismo que regula su proliferación. Estas enfermedades son de etiología multifactorial, es decir, pueden originarse por distintas causas que incluyen diversos aspectos de los hábitos vida, dieta, ocupación profesional; además pueden presentarse en casi cualquier tipo de tejido en el cuerpo humano, lo cual hace difícil su prevención.

En los últimos años se ha presentado un incremento en la cantidad de personas a nivel mundial que padecen algún tipo de cáncer. Además, estas enfermedades son una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en México por lo que se consideran un problema de salud pública grave.

Por si fuera poco, aunque hay distintas formas de tratamiento y numerosas investigaciones referentes a nuevas terapias, hasta ahora ninguna de ellas ha sido completamente efectiva para todos los tipos de cáncer, y en general, la terapéutica depende del tipo de cáncer, la etapa en la que se encuentre, y si hay o no metástasis.

Uno de estos tipos de cáncer es el de mama, en términos amplios, se refiere al conjunto de enfermedades que involucran crecimiento incontrolado de las células del tejido mamario. Es uno de los más frecuentes en mujeres a nivel mundial ya que aproximadamente el 16% de todos los casos de cáncer en mujeres son de este tipo. Además, en México es la primera causa de muerte de mujeres. A todo lo anterior, es preciso indicar que los tratamientos existentes para este tipo de cáncer no son completamente exitosos y que tienen muchas desventajas para los pacientes, como son: la gran cantidad de efectos adversos por la falta de selectividad de los mismos, el precio y la resistencia que generan ciertos tipos de cáncer de mama a agentes quimioterapéuticos. Por estos motivos el desarrollo de nuevos agentes más selectivos y que sean una alternativa ante la resistencia de otros continúa siendo importante en la investigación.

Trabajos desarrollados previamente por nuestro grupo de investigación encontraron que derivados de quinazolina, en específico de la quinazolin-2,4,6-triamina, sustituidos en posición 2,4 y/o 6 por benzamidas tienen actividad antitumoral *in vitro*. Algunos de estos derivados presentan cierta selectividad por una línea celular de cáncer de mama (MCF-7), de igual forma se ha encontrado que algunos derivados de quinazolina sustituidos por benzamidas en posición 6 presentan interacciones teóricas con el receptor estrogénico alfa

de humano al realizar estudios de acoplamiento molecular, lo cual puede explicar en cierta medida la presencia de actividad y selectividad hacia la línea celular de cáncer de mama

Con la intención de encontrar compuestos *hit** con actividad citotóxica, en este trabajo de tesis se sintetizaron derivados del *scaffold*** quinazolin-2,4,6-triamina colocando sustituyentes en las aminas en posición 2,4 y/o 6 que podrían tener como blanco el receptor estrogénico humano.

* *hit*. Un compuesto que posee la actividad farmacológica deseada comprobada por medio de estudios de evaluación de actividad biológica y que se busca optimizar para incrementar su actividad y/o mejorar sus propiedades.

** *scaffold*. La estructura base de una serie de compuestos bioactivos.

2. ANTECEDENTES

2.1. Aspectos básicos sobre el cáncer

El cáncer es un término empleado para agrupar un conjunto de enfermedades caracterizadas por el crecimiento y diseminación incontrolada de células anormales¹. Estas anomalías causan que una célula sana se torne en maligna debido a alteraciones en mecanismos de control que gobiernan la diferenciación y proliferación celular.²

El cáncer comienza con cambios en una o un pequeño grupo de células; dado que nuestros cuerpos están formados por más de un trillón de células que a su vez se agrupan para formar tejidos estas enfermedades pueden originarse en casi cualquier lugar del cuerpo humano.³ Los distintos tipos de cáncer tienen algunas similitudes, pero difieren en la manera en la que crecen y se propagan.⁴

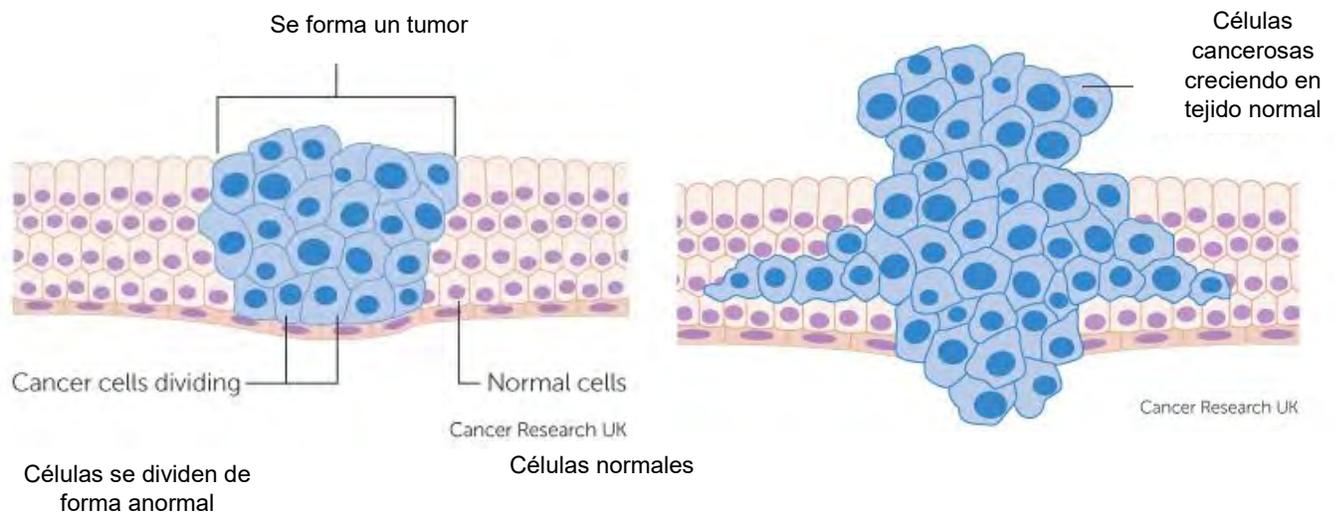


Figura 1. Crecimiento de células cancerosas en tejido normal. Tomada y modificada.³

Usualmente, el cuerpo tiene únicamente el número que se requiere de cada tipo de célula. Esto debido a que las células producen señales que controlan la cantidad y la frecuencia de su división.³ Normalmente, las células crecen y se dividen para formar nuevas a medida que el cuerpo las necesita, cuando las células normales envejecen o se dañan, mueren y nuevas las reemplazan. Si alguna de las señales de control no se presenta, este proceso ordenado se descontrola y las células pueden comenzar a crecer y a acumularse, lo que causa problemas en el área del cuerpo en el que se originó el proceso (tumor canceroso).^{3,5}

De esta manera, en todos los tipos de cáncer, algunas de las células del cuerpo comienzan a dividirse sin parar y se diseminan a los tejidos que están en derredor.⁵

2.2. Etapas de carcinogénesis

El proceso por el que las células sanas se transforman en cancerígenas se denomina carcinogénesis u oncogénesis, y está caracterizado por una serie de cambios genéticos y celulares que llevan finalmente a que se presente un crecimiento anormal de células. Es reconocida como un evento de múltiples etapas en el que se presentan distintas alteraciones moleculares y celulares.^{6,7}

La carcinogénesis está dividida conceptualmente en cuatro etapas: iniciación, promoción, conversión y progresión. Para hablar de un tumor cancerígeno se requiere la conversión de las células de neoplasias benignas (crecimiento anormal de células) a un estado maligno.⁶

- **Iniciación:** Anteriormente, el concepto de iniciación únicamente hacía referencia a cambios genéticos irreversibles que se transmiten de las células madres a su progeie (mutaciones). Sin embargo, estudios actuales han indicado que también implican eventos como cambios epigenéticos.
- **Promoción:** Comprende la expansión clonal de células iniciadas. Como la acumulación de mutaciones es proporcional a la frecuencia de divisiones celulares, o al menos a la frecuencia con la que las células troncales (células madre) son reemplazadas, la expansión clonal de las células iniciadas produce una población mayor de células que están en riesgo de sufrir nuevos cambios genéticos y conversión maligna.
- **Conversión:** Es la transformación de una célula neoplásica (tumoral) benigna en una que exprese un fenotipo maligno. Para este cambio se requiere que sucedan otras alteraciones genéticas.

La promoción contribuye a la expansión de una población de células iniciadas que están en riesgo de conversión. La conversión de una fracción de estas células, ocurre en proporción a la tasa de división celular, y a la cantidad de células que se dividen en el tumor benigno.

- **Progresión:** La progresión comprende la expresión del fenotipo maligno y la tendencia de células malignas de adquirir características más agresivas conforme pasa el tiempo. Algunas características del fenotipo maligno, son la inestabilidad genómica y el crecimiento incontrolado. En esta etapa, otros cambios genéticos y

epigenéticos pueden ocurrir nuevamente, incluyendo la activación de protooncogenes y la pérdida funcional de genes supresores de tumor.

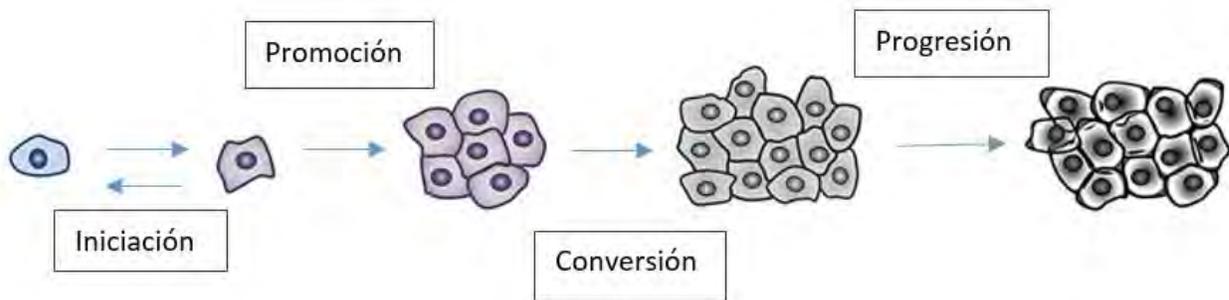


Figura 2. Etapas de carcinogénesis. Tomada y modificada.⁷

2.3. Cambios celulares y fenotipo maligno

La transformación de tumores benignos en malignos y la diseminación del cáncer está definida tanto por cambios intrínsecos en el genoma, como por la respuesta de un tejido u órgano a factores extrínsecos como lo son: factores de crecimiento, citoquinas y estímulos quimiotácticos.⁸

Como ya se mencionó, el cáncer involucra la conversión de un fenotipo benigno en una entidad invasiva con muchos pasos de por medio. En este proceso existe una gran cantidad de cambios genéticos e histopatológicos que incluyen la amplificación de genes específicos, expresión de marcadores tumorales, alteraciones en las células y en la arquitectura de tejidos.⁸

Estudios han demostrado que las células individuales de tumores malignos que crecen en animales y/o en humanos exhiben heterogeneidad bioquímica en los niveles enzimáticos, en inmunogenicidad, y en su respuesta a fármacos antitumorales. Esto ha hecho que sea sumamente difícil identificar los cambios esenciales que se producen al expresarse el fenotipo maligno.⁹ Existen propiedades o características de células malignas que generalmente se presentan *in vivo* o en cultivos celulares *in vitro*.

Características de células malignas *in vivo*:⁹

- Expresión de proteínas oncogénicas.
- Pérdida de productos proteicos de genes supresores de tumor.
- Alteraciones en patrones de metilación del DNA.
- Inducción de angiogénesis

- Diferenciación aberrante
- Autonomía de proliferación
- Inestabilidad genética.
- Capacidad de evitar respuesta inmunitaria antitumoral

Características de células malignas *in vitro*:⁹

- Cambios citológicos como incremento en el tamaño y cantidad de núcleos.
- Inmortalidad (Pueden tener un número de pases de cultivo indefinido)
- Disminuye requerimiento de suero.
- Pérdida de control de ciclo celular.
- Resistencia a apoptosis.

De igual forma, otros estudios sugieren que existen seis alteraciones en la fisiología de la célula que se relacionan con el fenotipo maligno:

- Autosuficiencia en señales de crecimiento
- Falta de sensibilidad a señales anti-crecimiento.
- Evasión de apoptosis.
- Replicación ilimitada
- Angiogénesis
- Metástasis e invasión de tejidos



Figura 3. Alteraciones fisiológicas en células debido al cáncer. Tomada y modificada. ¹

2.4. Causas de cáncer

Todos los tipos de cáncer son enfermedades genéticas, es decir, están relacionadas con cambios en el material genético y en los mecanismos que controlan la división y crecimiento celular.⁵ El conocimiento actual acerca de los mecanismos que ocurren durante el desarrollo

de estas enfermedades sugiere que todos los tipos de cáncer tienen un origen ambiental y otro genético; esto conlleva a que se requieren de la exposición a agentes externos y cambios genéticos para que se genere la enfermedad.¹¹

Los errores que ocurren durante la división celular que llevan a la transformación maligna, pueden estar influenciados tanto por procesos internos como por factores externos. Entre los procesos internos se incluyen las mutaciones por errores al azar durante la replicación del DNA que no son corregidas, mientras que los factores externos son agentes ambientales que afectan la tasa de mutagénesis y que pueden ocasionar daño al DNA; por tanto, los factores externos actúan por medio de la acumulación de alteraciones genéticas durante la división celular y, así incrementan el riesgo de padecer cáncer. Estos agentes ambientales se dividen en tres tipos: i) agentes químicos, ii) agentes físicos (radiaciones), iii) agentes biológicos (virus y bacterias).¹⁰

Datos epidemiológicos con variaciones temporales y geográficas, así como estudios de poblaciones migrantes y sus descendientes que adquieren el tipo de cáncer de mayor incidencia en el país al que migraron, indican que las exposiciones ambientales tienen una contribución sustancial al desarrollo de cáncer en humanos.^{12,13} Estos estudios, junto con la evaluación de hábitos y estilo de vida llevaron a la conclusión de que la mayoría de las muertes por cáncer (aproximadamente el 80%) en los países industriales puede atribuirse a aspectos como la dieta, infecciones y condiciones laborales.¹¹

2.4.1 Alteraciones genéticas

Después de numerosos avances se encontró que el cáncer involucra cambios dinámicos en el genoma. Existen dos tipos de genes que tienen un papel fundamental en la inducción del cáncer: los proto-oncogenes y los genes supresores del tumor.¹⁴ Estos genes codifican para muchos tipos de proteínas que ayudan a controlar el crecimiento y diferenciación celular. Se ha descubierto que existen mutaciones que producen oncogenes con ganancia de función, y alteraciones en genes supresores del tumor que producen la pérdida de su función lo cual contribuye al desarrollo de cáncer.^{14,17}

Un oncogén, es cualquier gen que codifica para una proteína capaz de transformar células en un cultivo o de inducir cáncer en animales, casi todos los oncogenes conocidos derivan de mutaciones en genes llamados proto-oncogenes cuyos productos participan en las rutas que controlan el crecimiento celular. Por otro lado, los genes supresores del tumor generalmente codifican para proteínas que inhiben la proliferación celular.¹⁷

De igual forma, la secuencia de DNA puede verse alterada como resultado de la replicación de errores introducidos por las polimerasas y por diversos agentes carcinogénicos. Si existe un cambio en la secuencia, sea cual sea la causa y este cambio no se corrige, las células comienzan a acumular mutaciones; si estos errores están en una región donde se encuentra un gen supresor de tumor o un proto-oncogen pueden llevar a la formación de neoplasias malignas.^{18,19}

2.4.2 Carcinógenos

Los carcinógenos son un tipo de agentes que pueden llevar al desarrollo de cáncer en animales y humanos. Existen carcinógenos que afectan directamente al DNA, mientras que otros no lo afectan, pero finalmente llevan a la generación de cáncer. Los carcinógenos no causan cáncer con una única exposición, algunos pueden causarlo sólo después de exponerse a altos niveles durante un tiempo prolongado. Además, para cada persona, el riesgo de desarrollar cáncer es distinto y depende de diversos factores que incluyen: el tipo de carcinógeno, la intensidad y la duración de la exposición.⁵

Una clasificación de los agentes carcinógenos los agrupa en endógenos y exógenos. Los exógenos incluyen radiaciones ionizantes y no ionizantes, compuestos químicos naturales y sintéticos, e inclusive agentes infecciosos como ciertos tipos de virus, bacterias y micotoxinas que suelen contaminar alimentos o estar en el medio ambiente. Por otro lado, los endógenos abarcan condiciones que ocasionan problemas en el sistema inmunitario y por tanto provocan inflamación crónica.¹³ En el microambiente del tumor, la inflamación contribuye a la proliferación y supervivencia de células malignas, angiogénesis, metástasis y la respuesta reducida a hormonas y agentes quimioterapéuticos. Existe evidencia de que mediadores de la inflamación pueden dañar el DNA de forma directa o indirecta, desestabilizar el genoma y contribuir a la acumulación de alteraciones genéticas.¹⁵

Otro tipo de clasificación resulta de dividir a los agentes exógenos en tres categorías como lo indica la siguiente tabla.

Tabla 1. Ejemplos de carcinógenos humanos.

Tipo de carcinógeno		
Físico	Químico	Biológico
Radiaciones electromagnéticas (Rayos X, Rayos UV)	<p>Carcinógenos de origen sintético (Hidrocarburos aromáticos policíclicos HAP, tiourea, 2-naftilamina y otros)</p> <p>Carcinógenos de origen natural (griseofulvina, quercetina, aflatoxina y otros)</p>	<p>Virus (Virus Epstein Barr, Virus de papiloma humano, Virus de Hepatitis B, entre otros)</p> <p>Bacterias (<i>Helicobacter pylori</i>)</p>

Por lo que respecta a los carcinógenos químicos, un compuesto es considerado carcinógeno cuando su administración a animales de laboratorio produce un incremento estadísticamente significativo en la incidencia de neoplasias malignas de diversos tipos histológicos en comparación con el grupo control que no fue expuesto al compuesto en cuestión.¹³

La mayoría de los carcinógenos químicos requieren de su conversión metabólica en intermediarios reactivos que se unan al DNA (pro-carcinógenos), pero algunos no requieren de la activación y pueden unirse de forma directa, estos dos tipos de compuestos tienen mecanismos genotóxicos. Sin embargo, existen compuestos que no reaccionan directamente con el DNA y aun así son carcinogénicos, por tanto, tienen mecanismos no genotóxicos.¹⁶

Cuando los carcinógenos químicos son internalizados por las células, frecuentemente son biotransformados, y los productos resultantes se excretan o se retienen en la célula. Dentro de la célula, los carcinógenos, o sus productos metabólicos, pueden afectar de forma directa o indirecta la regulación y la expresión de genes involucrados en el control de ciclo celular, reparación de DNA, diferenciación celular y apoptosis. Como se mencionó, existen carcinógenos que actúan por medio de mecanismos genotóxicos tales como la formación de aductos en el DNA, ruptura de cromosomas, fusión, delección, no segregación o no disyunción. Otros actúan por medio de mecanismos no genotóxicos tales como la inducción de la inflamación, inmunosupresión, formación de especies reactivas de oxígeno (ROS), activación de receptores (como el receptor de estrógenos) y silenciamiento epigenético.

Estos mecanismos, genotóxicos y no genotóxicos, pueden alterar las rutas de transducción de señales que finalmente resultan en hipermutabilidad, inestabilidad genómica, pérdida de control de proliferación y apoptosis.¹⁶

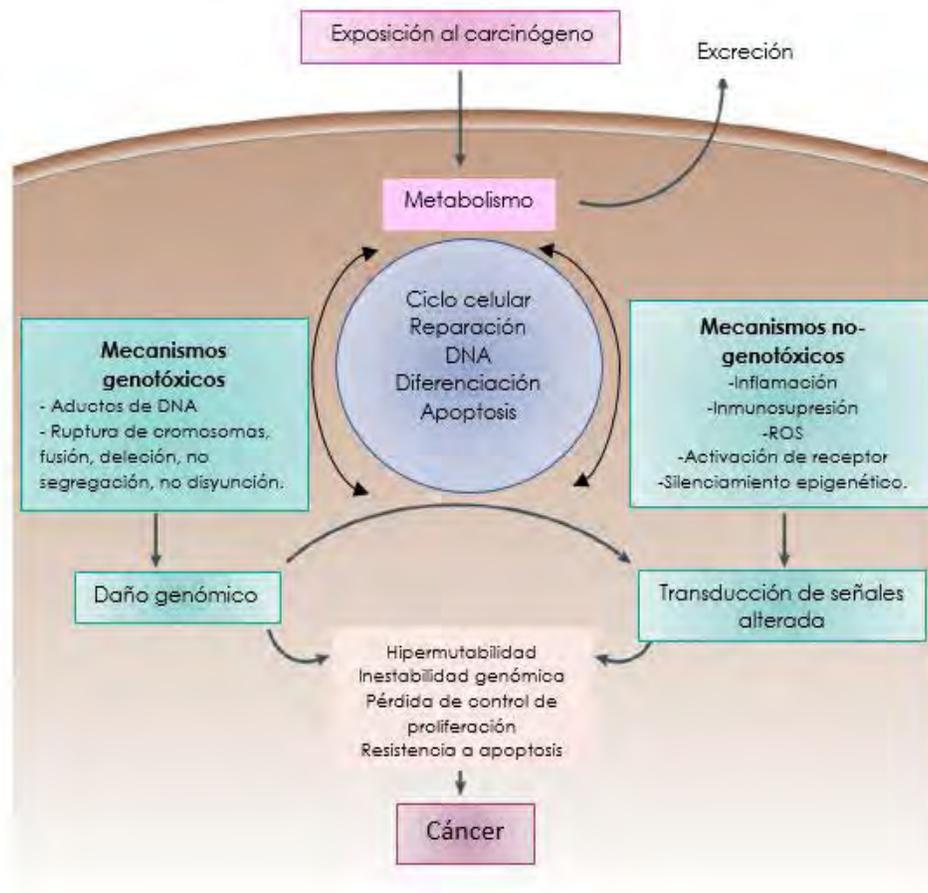


Figura 4. Mecanismos genotóxicos y no genotóxicos de carcinógenos químicos. Tomada y modificada.¹⁴

2.5. Tipos de cáncer

Los distintos tipos de cáncer pueden agruparse de acuerdo con el tipo de célula que le da inicio, y dependiendo del sitio anatómico en el que se presenta en primera instancia.³

Dependiendo del tipo de célula que le da origen, hay cinco categorías principales:

- **Carcinoma.** Inician en tejido epitelial que forma la piel o cubre órganos internos. Es el tipo más común de cáncer y debido a que existen distintos tipos de células epiteliales hay diferentes tipos de carcinomas. (Ej. Carcinoma de células escamosas, adenocarcinoma).

- Sarcoma. Inician en tejido conectivo o de soporte tal como hueso, cartílago, tendones o tejido fibroso. Son mucho menos comunes que los carcinomas y pueden agruparse en dos: osteosarcomas (sarcomas de hueso) y sarcomas de tejido blando (cartílago o músculo).
- Leucemias: Inicia en el tejido que forma la sangre (médula ósea). Genera un gran número de células sanguíneas anormales.
- Linfomas y mielomas. Los linfomas tienen su origen en células del sistema linfático llamadas linfocitos; cuando éstos comienzan a dividirse de forma anormal comienzan a formar tumores en nódulos linfáticos, bazo o médula ósea. Los mielomas también son conocidos como mielomas múltiples y es una enfermedad proliferativa de células B maduras, es decir, de células plasmáticas.^{3,20}
- Cáncer cerebral y de médula espinal. Inicia en células del sistema nervioso central o en las de la médula espinal. El tipo más común deriva de células de la glía y se conoce como glioma.

2.6. Metástasis

Un tumor que no ha adquirido un fenotipo invasivo se denomina tumor “*in situ*”. El hecho de que un tumor sea invasivo no sólo se refiere a la habilidad para colonizar tejidos adyacentes, sino también a la capacidad que posee para destruirlos.²¹

La metástasis tumoral se refiere al movimiento de células tumorales desde un tumor primario para llegar a colonización progresiva de distintos órganos distantes y formar un tumor secundario, y es la causa que en mayor medida contribuye a la muerte de pacientes con cáncer.^{21,22}

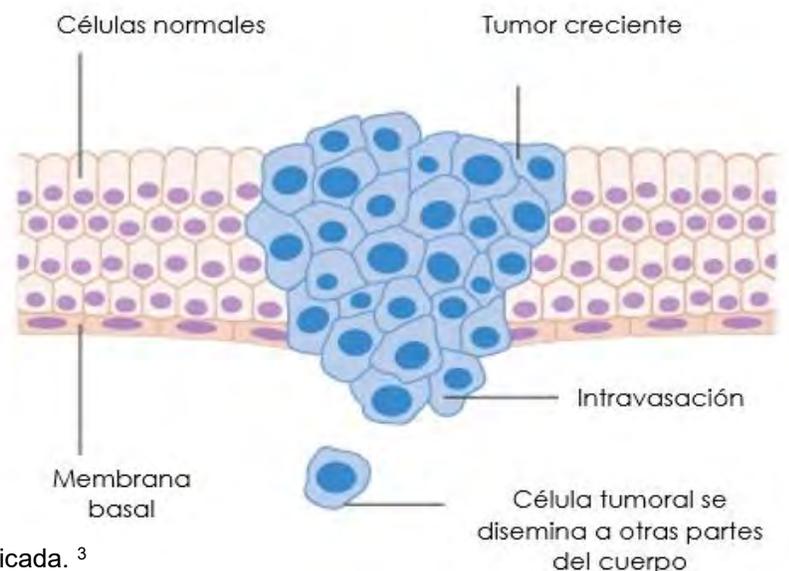


Figura 5. Inicio de metástasis. Tomada y modificada.³

Funcionalmente, las células tumorales comienzan a hacer metástasis por medio de la invasión de tejidos que rodean al tumor primario. Las células tumorales entran a la circulación sanguínea, ya sea directamente o por medio del sistema linfático; luego ocurre una extravasación de las mismas para que lleguen así a un sitio libre de tumores. Las vías que median la metástasis pueden operar en múltiples órganos o pueden ser sitio-específicas como en el caso de hueso y cerebro.²²

Como ya se mencionó, la acumulación de alteraciones genéticas ocurre en una o varias células pre-malignas, lo cual causa que éstas se conviertan a células malignas de origen clonal y den lugar a la formación de un tumor maligno primario. En este estadio, las células no son metastásicas ni invasivas, la habilidad se adquiere como resultado de una mayor cantidad de alteraciones genéticas.²³

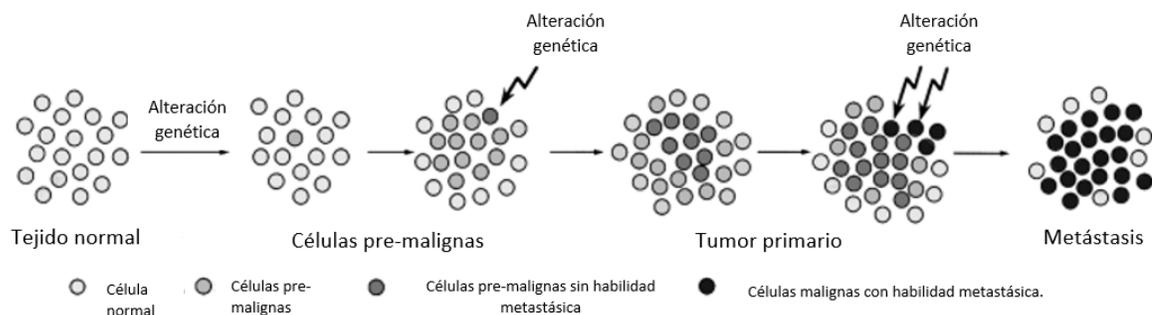


Figura 6. Etapas de carcinogénesis desde células normales hasta conversión a células malignas con habilidad metastásica en relación con la acumulación de mutaciones. Tomada y modificada.²³

El proceso metastásico puede iniciar en la etapa temprana o tardía de la formación del tumor primario²⁴, y puede requerir hasta décadas para completarse. El “combustible” para la metástasis es la inestabilidad genómica en todas sus formas. De esta manera, la metástasis consiste en cinco etapas que en conjunto se denominan cascada metastásica:

- **Invasión y migración.** Células individuales del tumor primario invaden tejido sano adyacente.
- **Intravasación.** Las células se adentran al sistema circulatorio y/o el sistema linfático. Después de adherirse a células endoteliales por medio de moléculas de adhesión, las células neoplásicas secretan enzimas que permiten la infiltración a los vasos sanguíneos.
- **Circulación.** Las células viajan por la circulación sanguínea y deben resistir las condiciones presentes en la sangre, que involucran altos niveles de oxígeno y la

presencia de linfocitos T citotóxicos, por lo que ocurre una selección de células tumorales particularmente resistentes y agresivas.

- Extravasación. Las células frecuentemente se quedan aglomeradas en los capilares de algún órgano y dejan la circulación sanguínea penetrando al endotelio por medio de enzimas proteolíticas o de proliferación.
- Colonización, proliferación y angiogénesis. La célula se establece en un tejido distante y comienza a formar un tumor secundario que luego induce angiogénesis para asegurar la vascularización.

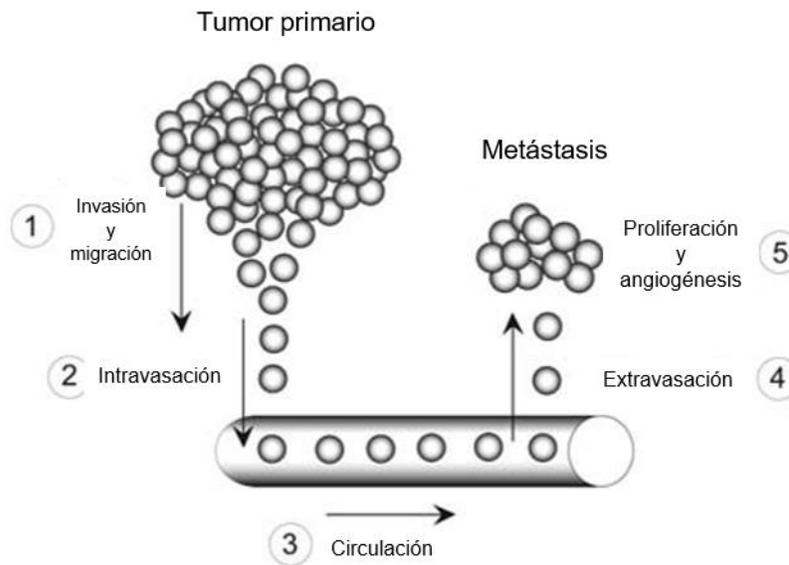


Figura 7. Las cinco etapas de la cascada metastásica. Tomada y modificada.²¹

2.7. Generalidades del cáncer de mama

El cáncer de mama es un término que agrupa distintas enfermedades proliferativas que comienzan en regiones del tejido mamario, el cual, está constituido por glándulas divididas en lóbulos, ductos, tejido adiposo, tejido conectivo y tejido linfático. Se distingue hasta por 21 distintos subtipos histológicos y al menos 4 diferentes subtipos moleculares, que son variables en su manifestación, respuesta al tratamiento y factores de riesgo.^{25,26}

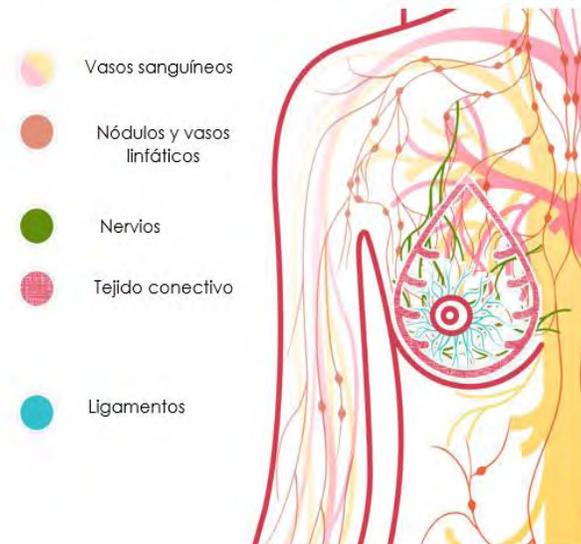


Figura 8. Anatomía de mamas. Tomada y modificada.³⁰

Es el tipo de cáncer más común en el mundo junto con el cáncer de pulmón, la quinta causa de muerte por cáncer y la principal causa de muerte por cáncer en mujeres. La tasa mundial de cáncer de mama excede la de los demás tipos de cáncer y su incidencia va en aumento, de manera que es un grave problema de salud a nivel mundial.²⁵

Existen una gran cantidad de factores que incrementan el riesgo de desarrollar cáncer de mama, entre ellos se encuentran: uso de anticonceptivos orales, antecedentes familiares con cáncer de mama, edad, dieta, desarrollo previo de otros tipos de cáncer, alta densidad de tejido en mamas, niveles más altos de hormonas estrogénicas, entre otros.³ Dos genes asociados con el desarrollo de cáncer de mama son: el gen de susceptibilidad para cáncer de mama 1 (*Brca1*) y el gen de susceptibilidad para cáncer de mama 2 (*Brca2*). Mutaciones en estos genes confieren un riesgo de desarrollar cáncer de mama del 60-85%; sin embargo, estas alteraciones únicamente causan del 2 al 3% del total de los casos.³⁸

2.7.1. Tipos de cáncer de mama

El cáncer de mama en general es considerado como un tipo de cáncer heterogéneo ya que comprende distintos perfiles fenotípicos y morfológicos, por tanto, posee diferentes comportamientos clínicos.^{27,28}

Una forma de agrupar a los tipos de cáncer de mama está basada en si son *in situ* o invasivos:

- Carcinoma ductal *in situ* (DCIS). Se refiere a una condición en la que las células anormales reemplazan a las células epiteliales de los ductos y puede hacer que estos se expandan considerablemente al igual que los lóbulos. Se considera una

forma de cáncer de mama no invasiva debido a que las células anormales no crecen más allá de dónde se originaron. ²⁶

- Carcinoma lobular *in situ* (LCIS). Se refiere a la condición en la que células malignas comienzan a crecer en los lóbulos y es menos común que el DCIS.
- Otros tipos de carcinomas *in situ* que tienen características de los dos anteriormente mencionados. ²⁶
- Invasivo. La mayoría de los tipos de cáncer de mama son invasivos, en los que las células malignas crecen en otros tejidos además de ductos y lóbulos. De este modo, existe la etapa local, en la que el cáncer está confinado en el tejido mamario, la etapa regional, en la que el o los tumores se han diseminado a tejido cercano o adyacente a nódulos linfáticos y la etapa distante, cuando ya hay metástasis. ²⁶

Clínicamente los tipos de cáncer de mama están caracterizados en tres, esta clasificación está basada en sus propiedades inmunohistoquímicas, es decir, su estatus hormonal.²⁹

Los sub-tipos son:

- HR positivos: Aquellos que son positivos para el receptor estrogénico (ER) y para el receptor de progesterona (PR), y a su vez pueden dividirse en:
 - Luminal A: generalmente son ER⁺ y/o PR⁺ y HER-2⁻, se presenta en el 74% de los casos.
 - Luminal B: generalmente son ER⁺ y/o PR⁺ y HER-2⁺, se presenta en el 10% de los casos.
- HER-2 positivos: Aquellos positivos para el factor 2 de crecimiento epidérmico humano pero negativos para los receptores hormonales (HR), se presenta en el 4% de los casos.
- Triple negativo: También son llamados subtipo parecido al basal, y se refiere a cualquier tipo de cáncer de mama que no expresa los genes que codifican para ER, PR o HER-2, se presenta en el 12% de los casos.

2.8. Estadísticas en México y en el mundo

De acuerdo con la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC), en el 2012 se presentaron alrededor de 14.1 millones de casos de cáncer a nivel mundial, de los cuales, 8 millones ocurrieron en países económicamente desarrollados en los que se encuentra el 82% de la población. Para el año 2030 se espera que la carga mundial incremente a 21.7 millones de casos nuevos y 13 millones de muertes por cáncer debido al crecimiento e incremento de edad de la población. Sin embargo, la carga futura estimada

probablemente será mayor por la adopción de estilos de vida con factores que se sabe incrementan el riesgo de desarrollar cáncer.¹

2.8.1. Incidencia y muertes por cáncer en el mundo

De acuerdo con las estimaciones de la Organización Mundial de la Salud (OMS), los diferentes tipos de cáncer causan casi tantas muertes como las enfermedades coronarias y cardiovasculares.³¹

En el 2012 se presentaron 8.2 millones de muertes por cáncer en el mundo (alrededor de 22,000 muertes al día) 2.9 millones de estas muertes ocurrieron en países desarrollados, mientras que 5.3 millones de muertes se presentaron en países no desarrollados.¹

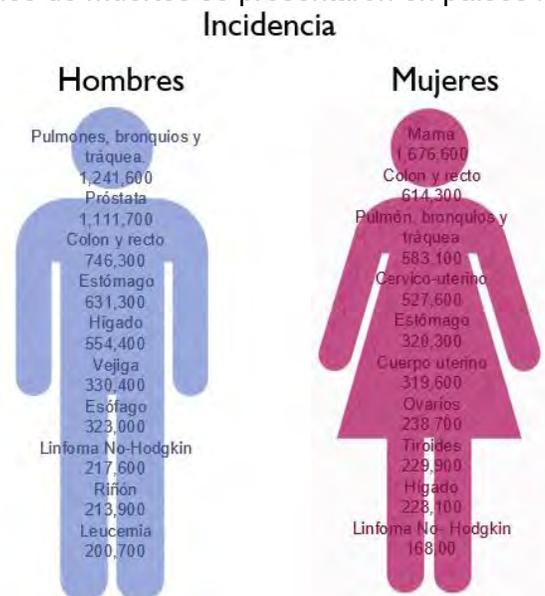


Figura 9. Incidencia de los más frecuentes tipos de cáncer en el mundo durante el 2012. Tomada y modificada.³²

En los países económicamente desarrollados, los tres tipos de cáncer que son diagnosticados con mayor frecuencia son: cáncer de próstata, pulmón y colon en hombres, y de colon, pulmón y mama en mujeres. Por otro lado, en países en vías de desarrollo, los tres tipos de cáncer de mayor incidencia son: cáncer de hígado, pulmón y estómago en hombres, y cáncer de mama, cérvico-uterino y de pulmón en mujeres.



Figura 10. Número de muertes causadas por los más frecuentes tipos de cáncer en el mundo durante el 2012. Tomada y modificada.³²

2.8.2. Mortalidad y morbilidad en México

En la infancia y en la adolescencia se considera que el cáncer es una enfermedad poco frecuente en comparación con los adultos. En México, durante el 2013, la mayor morbilidad hospitalaria por tumores malignos (población que ingresa a un hospital por dicha enfermedad) tanto en mujeres como en hombres menores de 20 años estuvo dada por cáncer en órganos hematopoyéticos, seguida del sistema linfático, y de órganos que forman al sistema nervioso central. En cuanto a mortalidad, de cada 100 defunciones por cáncer en población entre 0 y 19 años, 51.7% corresponde a hombres, mientras que 42.9% a mujeres. Por tipo de cáncer, el de órganos hematopoyéticos presenta la tasa más alta de mortalidad, seguido por cáncer en órganos que forman el sistema nervioso central, y de hueso.³³

La OMS señala que la incidencia del cáncer incrementa con la edad, por lo cual, el envejecimiento es un factor fundamental en su aparición y desarrollo, ya que implica una exposición acumulada a factores de riesgo para determinados tipos de cáncer.^{33,34} Durante el 2013, la mayor morbilidad hospitalaria en población masculina mayor de 20 años estuvo dada por cáncer de estómago y órganos digestivos, cáncer de próstata y cáncer de órganos hematopoyéticos. Por otro lado, en mujeres mayores de 20 años los tres tipos de cáncer con mayor morbilidad hospitalaria fueron: cáncer de mama, cáncer cérvico-uterino, cáncer de estómago y órganos digestivos. En lo que respecta a la mortalidad, del total de

defunciones por cáncer en población mayor de 20 años durante el año 2013, el 48.8% ocurrió en hombres y 51.2% en mujeres. El primer lugar con 32.52 casos por cada 100 mil habitantes fue cáncer de estómago y órganos digestivos, el segundo, con 10.58 defunciones por cada 100 mil habitantes, fue cáncer de pulmón y órganos respiratorios; finalmente, en tercer lugar, se ubicó el cáncer de próstata con 8.44 defunciones por cada 100 mil habitantes.³³

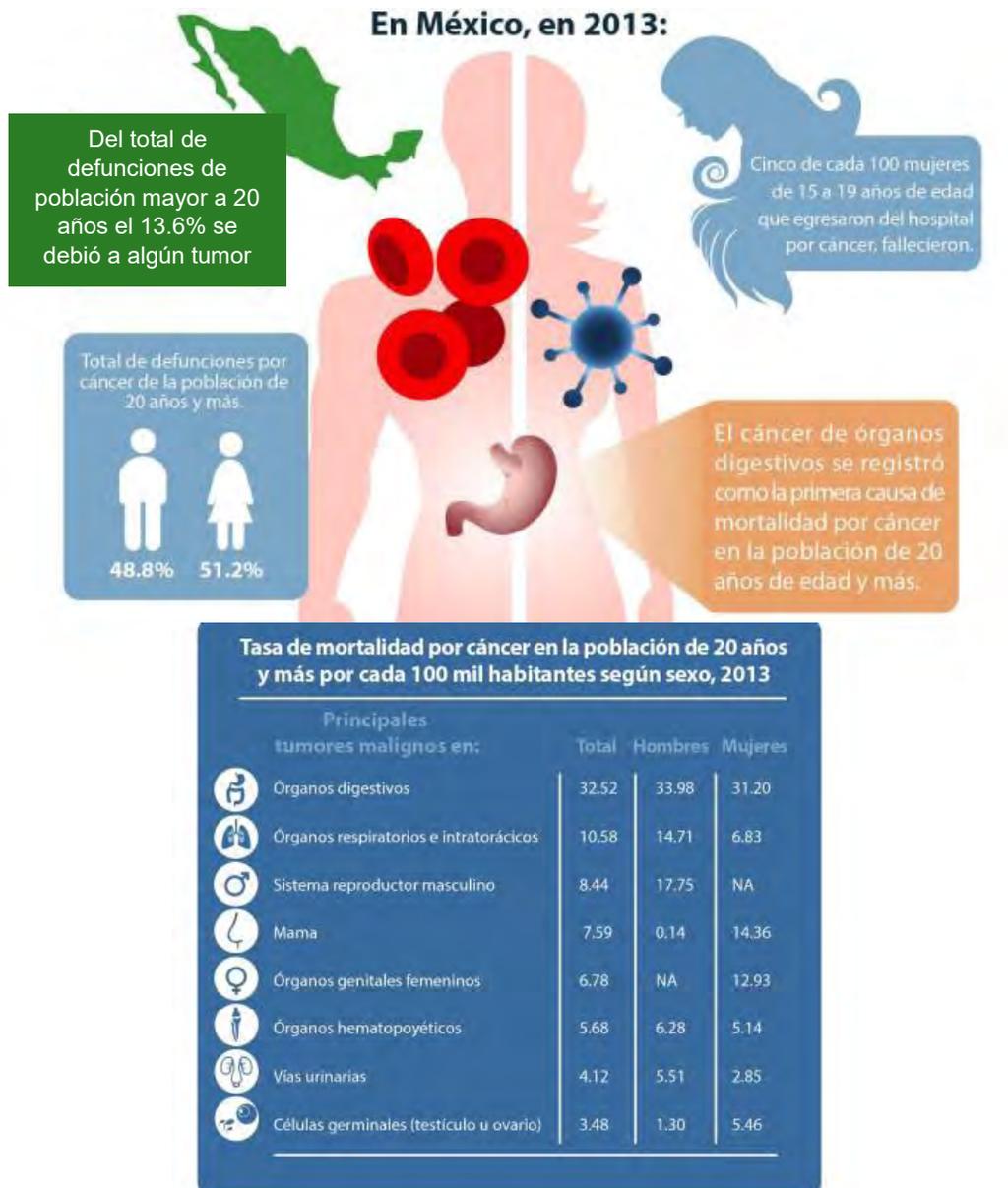


Figura 11. Tasa de mortalidad por cáncer en México durante el 2013 en población mayor a 20 años. Tomada y modificada.³³

2.8.3. Incidencia y mortalidad por cáncer de mama a nivel mundial

En el ámbito mundial, el cáncer de mama es el tipo de cáncer más frecuente en mujeres con un estimado de 1,500,000 casos nuevos diagnosticados anualmente y 4,000,000 muertes, lo cual representa el 16% del total de los casos de cáncer en este sector de la población, mientras que en hombres únicamente representa el 1% del total de casos. De igual forma es la principal causa de muerte por tumor maligno en la mujer en países en vías de desarrollo y la segunda en países desarrollados (después del cáncer de pulmón).^{35,36,37}

La tendencia de mortalidad es ascendente debido a una mayor incidencia en la enfermedad, el envejecimiento poblacional, la falta de tratamientos efectivos y la resistencia de las células tumorales a las opciones terapéuticas actuales.³⁵

2.8.4. Incidencia y mortalidad por cáncer de mama en México

En México a partir del año 2006, el cáncer de mama desplazó al cáncer cérvico-uterino para así ubicarse como la primera causa de muerte por cáncer en la mujer. Anualmente, se estima una incidencia de 20,444 casos en mujeres, aproximadamente 35.4 casos por cada 100,000.³⁵ En el año 2013, se registraron 5,405 defunciones con una tasa de 16.3 muertes por cada 100,000 mujeres. Las ciudades que presentan una mayor mortalidad por cáncer de mama en México son Chihuahua, Coahuila, Sonora y Nuevo León.³⁶



Figura 12. Datos estadísticos referentes al cáncer de mama en México durante el 2014. Tomada y modificada.³³

2.9. Tratamiento de cáncer

Actualmente existen varias alternativas para el tratamiento de cáncer que pueden emplearse de forma individual o combinada dependiendo del tipo de cáncer, si éste se encuentra *in situ* o ha hecho metástasis y del estado físico del paciente.^{5,38}

Entre las opciones de tratamiento se encuentran principalmente la cirugía, radioterapia, y quimioterapia, sin embargo, existen otras alternativas como lo son la terapia hormonal y la terapia dirigida que pretenden tener una mayor eficacia y beneficios para el paciente.³⁸

2.9.1. Cirugía

La cirugía involucra la extracción del tumor maligno y tejido circundante, que de igual forma podría ser canceroso, mediante una operación.³⁰ Es empleada para prevenir, diagnosticar y tratar distintos tipos de cáncer. De igual forma, una cirugía puede usarse como tratamiento de otros problemas relacionados con estas enfermedades. En algunas ocasiones, una sola cirugía puede ayudar con más de uno de estos objetivos.⁴

En algunos casos, la cirugía es el único tratamiento que se necesita; generalmente, se usa para tratar cáncer *in situ* y que no se encuentra en una etapa avanzada.³ La cirugía se ha empleado para tratar distintos tipos de cáncer por muchos años y, como ya se mencionó, es un elemento clave para diagnosticar y determinar qué tanto pudo propagarse (proceso llamado clasificación por etapas o estratificación). Los avances continuos en técnicas quirúrgicas han permitido realizar operaciones en un número mayor de pacientes con mejores resultados.³⁸

Los objetivos principales de una cirugía oncológica son:

- Cirugía de diagnóstico y estratificación: En ciertos casos la única forma de saber si una persona tiene cáncer y de qué tipo de cáncer se trata es realizando un procedimiento conocido como biopsia, el cual, consiste en la remoción de una muestra del tejido para posteriormente hacer estudios citológicos.⁴
- Cirugía curativa: Se emplea cuando el tumor está *in situ* y es posible que pueda extirparse por completo.
- Cirugía paliativa: Se realiza para tratar complicaciones por cáncer avanzado. Se puede usar para corregir un problema que cause incomodidad o incapacidad.

Es necesario tomar en cuenta que una cirugía no es la mejor opción para tratar cáncer que hizo metástasis, o tumores malignos que se encuentran cerca de zonas con muchos vasos sanguíneos o de tejidos delicados.³

2.9.2. Radioterapia

La radioterapia emplea partículas u ondas de alta energía (rayos X, rayos de electrones o protones) para destruir o dañar células malignas. La radiación de alta energía causa alteraciones en el material genético de las células, por tanto, evita la capacidad de proliferar y las lleva a la muerte.^{38,39}

A pesar de que la radiación daña tanto células normales como malignas, el objetivo de la radioterapia es maximizar la exposición a las células anormales. Las células normales, generalmente pueden reparar los daños de forma más rápida y restablecer su función normal a diferencia de las células malignas que, por otra parte, no son tan eficientes para reparar el daño causado por la radiación, lo cual resulta en la muerte diferencial de células cancerosas.³⁹

Es uno de los tratamientos más comunes para cáncer y se incluyen estrategias combinadas con otros tipos de tratamiento como cirugía, quimioterapia o inmunoterapia. Si es usada antes de cirugía (terapia neo-adyuvante) la radiación puede ayudar a disminuir el tamaño del tumor, mientras que si se usa después (terapia adyuvante) la radiación ayuda a destruir células malignas que quedan después de la extracción del tumor.³⁹

Existen dos formas de radioterapia, la más común en la práctica clínica es por radiación externa e involucra la exposición de la parte del cuerpo en donde se encuentra el tumor a rayos de alta energía, la otra es la radiación interna en la que la exposición es por fuentes radioactivas administradas por medio de catéteres al interior del cuerpo. Esta última forma es de uso frecuente en cáncer de próstata, ovario y cervical.³⁹

Aproximadamente el 50% de los pacientes con cáncer reciben radioterapia en el curso de su enfermedad. Estimaciones indican que la radioterapia contribuye en un 40% a la recuperación de pacientes con cáncer que se someten a este tratamiento.^{38,39}

Como ya se mencionó el blanco biológico de la radiación es el DNA, y puede tener un efecto directo o indirecto sobre el mismo. La radiación puede interactuar directamente con el material genético de las células y causar alteraciones, o el daño puede ocurrir de forma indirecta debido a la producción de radicales libres con la radiación.³⁹

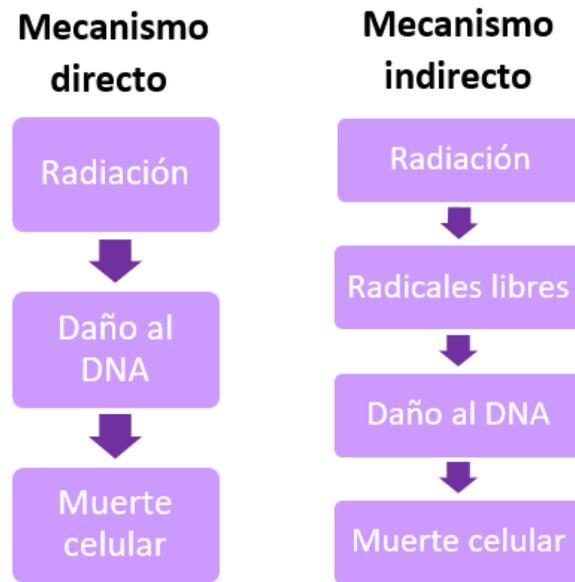


Figura 13. Mecanismos directo e indirecto por los que la radiación causa alteraciones en el material genético de las células. Tomada y modificada.³⁹

En comparación con la cirugía, la radioterapia tiene la ventaja de ser no invasiva, o ser menos invasiva y preservar órganos. A pesar de ello, estos pueden verse afectados por los efectos adversos que tiene este tratamiento. La incidencia y severidad de un efecto adverso específico depende de cómo se aplica la terapia y muestra variabilidad entre pacientes incluso después de tratamiento estrictamente idéntico.⁴⁰

Los efectos adversos de la radioterapia se manifiestan en tejidos y órganos que han sido irradiados. Los efectos iniciales o tempranos inician después de pocas semanas después de completar la terapia, estos incluyen: eritema de piel, descamaciones de la piel, náuseas y diarrea. Mientras que los efectos tardíos generalmente se presentan después de meses o incluso años y pueden ser: fibrosis asociada a radiación, daño vascular, daño neuronal e inclusive desarrollo de tumores secundarios malignos inducidos por radiaciones.⁴⁰

2.9.3. Quimioterapia

La quimioterapia involucra el uso de compuestos químicos para destruir las células tumorales o al menos limitar su proliferación.⁴¹ Mientras que en la radioterapia y en la cirugía se logra un efecto únicamente en el sitio de aplicación o extracción, la quimioterapia surte su efecto a través de todo el cuerpo, por ello se le llama terapia sistémica.³⁸

El uso de los agentes quimioterapéuticos inició en 1940 con las mostazas nitrogenadas, desde entonces, se han desarrollado una gran cantidad de compuestos útiles para el tratamiento contra cáncer.⁴¹

Todos los agentes quimioterapéuticos empleados para el tratamiento de cáncer ejercen su efecto mediante la disrupción del ciclo celular mediante la alteración de uno o más procesos que finalmente llevan a su muerte, de forma que también se les conoce como agentes citotóxicos quimioterapéuticos.⁴²

En lo que respecta a la práctica clínica, en ocasiones un solo agente puede ser empleado para tratar el cáncer, sin embargo, la mayoría de las terapias involucran la combinación de varios agentes de distintas clases. Los principios que se siguen para que el régimen terapéutico en combinación sea adecuado son:⁴²

- Los fármacos en cuestión deben actuar en distintas fases del ciclo celular para que resulten más efectivos.
- Los fármacos en combinación deben ser activos por si solos.
- Los mecanismos de acción deben ser diferentes para así permitir efectos aditivos o sinérgicos.

2.9.3.1. Clasificación de agentes quimioterapéuticos

Una forma útil de clasificar a los agentes quimioterapéuticos es con base a su mecanismo de acción, de esta manera, se de dividen en:

- Anti-metabolitos: Su mecanismo está basado en la interacción con rutas biosintéticas esenciales. Análogos estructurales de pirimidinas o purinas que se incorporan a la célula y causan la disrupción de la síntesis de ácidos nucleicos. Algunos ejemplos de anti-metabolitos son el 5-fluorouracilo (análogo de pirimidina) y mercaptopurina (análogo de purina).
- Agentes que interactúan con DNA: Agrupa a una gran cantidad de compuestos que a su vez se sub-clasifican de acuerdo con el tipo de interacción que tienen con el DNA. ⁴¹
- Agentes anti-tubulina: Interfieren con la dinámica de microtúbulos (formación del huso o desestabilización) y por tanto con la división celular. Los principales miembros de esta familia son los taxanos (paclitaxel, docetaxcel) y los alcaloides de la vinca (vinblastina, vincristina).

Tabla 2. Sub-clasificación de agentes que interactúan con DNA

Tipo de agente	Mecanismo de acción	Ejemplos
Agentes alquilantes	Forma enlaces covalentes con las bases nitrogenadas en DNA y/ o RNA	Dacarbazina, procarbazina,
Agentes de entrecruzamiento	Se unen al DNA en una o ambas hebras.	Complejos de platino (cisplatino, carboplatino, oxaliplatino), mostazas nitrogenadas (ciclofosfamida, ifosfamida), nitrosurea.
Agentes intercalantes	Tal como su nombre lo indica, se intercalan entre las hebras o se unen entre los pares de bases.	Antraciclinas (doxorubicina, epirubicina, actinomicina-D)
Inhibidores de la enzima topoisomerasa	Inhiben las enzimas responsables del estado topológico del DNA, las cuales en general cortan o unen las hebras.	Irinotecan, etopósido
Agentes que causan rupturas en el DNA	Interactúan con el DNA y causan la escisión de las hebras en el sitio de unión.	Bleomicina

En la actualidad, con el incremento en la incidencia del cáncer, tratamientos que involucran el uso de agentes quimioterapéuticos citotóxicos son ampliamente usados debido a su efectividad, sin embargo, una de las desventajas que representa su administración es la gran cantidad de efectos adversos que producen, entre las que destaca: la supresión de la médula ósea, lesiones del tracto gastrointestinal, pérdida del cabello, cansancio y náuseas. Estos efectos se deben a la falta de selectividad de los agentes quimioterapéuticos, ya que actúan tanto en células tumorales como en células sanas (en especial en células de alto recambio).⁴¹

2.9.4. Tratamiento de cáncer de mama

Como ya se mencionó, el cáncer de mama involucra a un grupo de enfermedades heterogéneas con diferentes fenotipos, prognosis y respuesta a la terapia, por lo que el tratamiento debe ser, en general, multidisciplinario^{43, 44}, se deben considerar los factores

relacionados al tumor, como es el tamaño inicial, la localización del mismo, si existe multifocalidad (tumores en la misma región de la mama) o multicentricidad (tumores en distintas regiones de la mama), la presencia de expresión de receptores hormonales y de otros factores como el receptor del factor de crecimiento epidérmico HER-2, la presencia de diseminación a ganglios axilares o la existencia de metástasis a distancias (óseas, hígado, pulmón, sistema nervioso central).⁴⁴

- Cirugía

A partir del diagnóstico, es posible determinar si el tumor en cuestión es candidato a tratamiento quirúrgico. En este sentido, existen dos estrategias: la lumpectomía o cirugía conservadora, en la cual se retira el tumor de la zona afectada sin necesidad de retirar toda la mama, y la mastectomía donde se retira la mama en su totalidad (con o sin reconstrucción).⁴⁴

- Radioterapia

La radioterapia tiene como objetivo disminuir la posibilidad de recurrencia local, y con ello mejorar la supervivencia del paciente. Por esta razón, se encuentra indicada en todas las pacientes que son sometidas a cirugía conservadora.⁴⁴

- Quimioterapia

La efectividad de la quimioterapia depende de múltiples factores: tamaño del tumor, número de nódulos linfáticos involucrados, la presencia de receptor estrogénico, receptor de progesterona y la cantidad de HER-2 que expresen las células tumorales. Las células triple negativas y HER-2⁺ en general, son más sensibles a la quimioterapia, mientras que, las que son ER⁺ /PR⁺ responden menos. Distintas investigaciones han establecido que la combinación de fármacos puede ser más efectiva que el tratamiento con un solo agente quimioterapéutico.²⁶

Dentro de la quimioterapia existen otro tipo de terapias sistémicas como son la terapia hormonal y la terapia dirigida a un blanco específico. En este sentido, la terapia hormonal se encarga de evitar la acción de hormonas producidas por el cuerpo o disminuir sus niveles, ya que en algunos casos actúan promoviendo el crecimiento del tumor. Un ejemplo son los estrógenos, hormonas producidas principalmente por los ovarios y que promueven el crecimiento de tumores ER⁺/PR⁺; los pacientes con este tipo de tumor pueden ser tratados con terapia hormonal (o endócrina) para disminuir los niveles de estrógeno.²⁶

Aproximadamente el 84% de todos los tipos de cáncer de mama expresan receptores hormonales. Las células tienen receptores que unen a las hormonas estrógeno o progesterona. La terapia endócrina reduce el riesgo de recurrencia de esta clase de tumores y generalmente es usada después de la cirugía (terapia adyuvante).^{4,45}

Existen distintos tipos de terapia hormonal que emplean diversos mecanismos para evitar que los estrógenos promuevan el crecimiento de tumores, la mayoría disminuyen los niveles de estrógeno o evitan que actúe sobre las células tumorales.⁴

Tabla 3. Tipos de agentes empleados en terapia hormonal.

Tipo de agente	Ejemplos	Mecanismo de acción
Fármacos que bloquean el receptor de estrógeno	Tamoxifen	Evita la unión de estrógenos con el receptor en células de mama, en células de otros tejidos actúa de forma similar a los estrógenos, por ello se le conoce como un modulador selectivo del receptor de estrógeno.
Fármacos que bloquean el receptor de estrógeno	Fulvestrant	Bloquea los receptores de estrógeno en todos los tejidos.
Fármacos que disminuyen los niveles de estrógeno	Inhibidores de la enzima aromatasa (Anastrozol)	Evitan la producción de estrógenos al bloquear la enzima encargada de su generación (aromatasa)

Por otro lado, la terapia dirigida permite que los fármacos interactúen selectivamente con blancos moleculares (típicamente proteínas), así pues, es sabido que aproximadamente el 14% de los tipos de cáncer de mama sobreexpresan el oncogen *Her-2* lo cual, lo hace un buen blanco terapéutico.⁴⁵ Trastuzumab es un anticuerpo monoclonal cuyo blanco es la proteína HER-2, su uso junto con agentes quimioterapéuticos ha demostrado reducir el riesgo de recurrencia y muerte en comparación con el uso de agentes quimioterapéuticos solos.⁴

2.9.4.1. Receptor de estrógeno como posible blanco terapéutico

Las hormonas esteroideas son moléculas hidrofóbicas que son transportadas a través de la sangre unidas a la globulina y que son capaces de difundir dentro y fuera de la célula. Los estrógenos forman parte de este tipo de hormonas, son derivados del colesterol que comparten una estructura común de cuatro anillos y entre sus tejidos blancos se encuentran las mamas, el endometrio, hueso, cerebro, hígado y corazón. Existen tres tipos de estrógenos: estrona, estradiol y estriol. El estriol es el de mayor concentración durante el embarazo, mientras que el estradiol en mujeres pre-menopáusicas y la estrona en mujeres post-menopáusicas.⁴⁶

Los receptores de estrógeno (ER) pertenecen a la familia de receptores cuyos factores de transcripción están regulados por ligando y que traducen señales hormonales en una gran variedad de respuestas fisiológicas en distintos órganos. Los dos ER estructuralmente relacionados, ER α y ER β , son productos de dos genes que son diferencialmente expresados en tejidos. El estradiol tiene la mayor afinidad por los ER, seguido por el estriol y la estrona.⁴⁷

El ER α (único detectado por inmunohistoquímica) es responsable de inducir la señal de mitosis en células epiteliales de glándulas mamarias, útero y ovarios. En glándulas mamarias sanas, el estradiol (E₂) se une a ER α y ER β y controla la proliferación y diferenciación celular; ambas isoformas se expresan en niveles bajos y similares en tejidos normales, mientras que en tejidos cancerosos tiene una mayor expresión.^{46,47}

Como se mencionó anteriormente, los pacientes con cáncer de mama ER⁺/PR⁺ pueden ser tratados por medio de dos estrategias: Antagonizando el receptor ER con anti-estrógenos y evitar así la unión de ligandos agonistas o bloqueando la síntesis de E₂ con inhibidores de la enzima aromatasa. Para el caso específico de antagonistas del receptor ER, el sitio de unión de los compuestos en cuestión es el dominio de unión a ligando, el cual, consiste de doce alfa hélices (H1-H12) y una horquilla beta. Cuando un antagonista se une al sitio, la hélice H12 se desplaza de su lugar y distorsiona el sitio de unión con lo cual se evita la activación del receptor.⁴⁸

Aunque ambas estrategias han resultado eficaces para muchos pacientes, otros tantos no responden de la forma esperada a los tratamientos ya existentes, además algunos tipos de cáncer de mama han desarrollado resistencia contra los agentes de terapia hormonal.^{47,49}

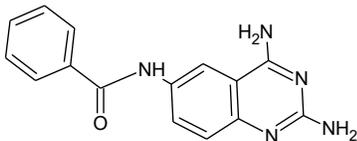
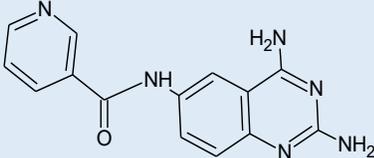
2.9.4.2. Derivados de quinazolininas como opción terapéutica

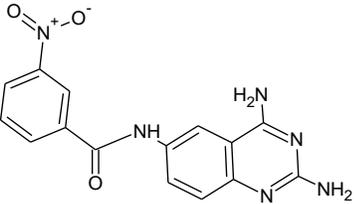
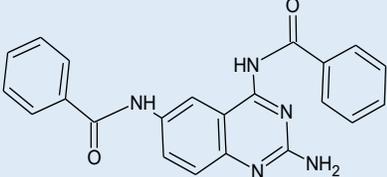
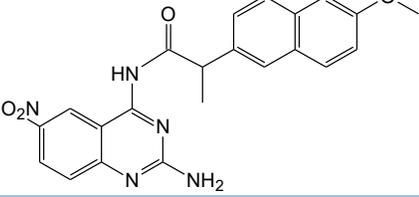
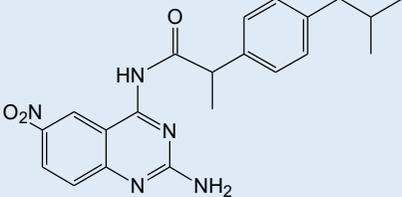
A pesar de los avances que se han realizado en el manejo quimioterapéutico de los pacientes con cáncer, y en específico los que padecen algún tipo de cáncer de mama, el reto de encontrar nuevos agentes con mayor selectividad, menos efectos adversos y mayor efectividad sigue siendo sumamente importante.⁵⁰

En el transcurso de identificar distintas sustancias químicas que podrían servir como prototipos para diseñar nuevos agentes antitumorales, diferentes investigaciones han prestado particular atención al núcleo de quinazolina, el cual, pertenece al grupo de estructuras privilegiadas en química farmacéutica dado que aparece en diversos compuestos con actividades biológicas distintas, además ha demostrado actividad contra células tumorales y eficacia terapéutica contra tumores sólidos.^{51,52}

En nuestro grupo de investigación se encontraron 6 derivados de quinazolina que presentaron actividad contra las líneas tumorales de cáncer de mama (MCF-7) y no citotoxicidad pronunciada en una línea celular no cancerosa. Este hallazgo da lugar a seguir buscando nuevos derivados con patrones estructurales parecidos a los compuestos estudiados.

Tabla 4. Resultados de la evaluación de la actividad citotóxica de derivados de quinazolina sintetizados por el grupo de investigación.

Compuesto	% de inhibición a 50 μ M	
	MCF-7	FGH
	84.3 \pm 8.1	9.46
	3.4 \pm 0.3	NC

	100	NC
	100	46.97
	75.5±4.9	NC
	66.9±6.8	NC
Tamoxifen (10 μM)	29.61±2.9	9.87±0.4

NC: no citotóxico

2.9.5. Acoplamiento molecular

La comprensión de la forma en la que un ligando reconoce e interactúa con su receptor es de gran importancia en la investigación farmacéutica. El diseño de fármacos basado en la estructura se refiere al uso sistemático de información estructural (Ej. Receptores) obtenidos experimentalmente o por modelado computacional y su propósito es diseñar moléculas con atributos estructurales y electrostáticos específicos que sean afines al receptor.⁵³

Las técnicas computacionales frecuentemente han sido usadas para completar estudios experimentales, ayudar con el análisis de datos y la mejora de resultados. El acoplamiento molecular o *docking* es uno de los métodos más empleados en el diseño de fármacos basado en la estructura por su habilidad para predecir, con cierto grado de exactitud, la conformación de una molécula y cómo interacciona con el sitio de unión de su receptor. De

esta manera puede ser útil, no sólo para identificar y priorizar la clase de compuestos que se estudiarán, sino que también permite disminuir el número de compuestos a evaluar.^{53,52}

El acoplamiento molecular es una de las técnicas más populares y tiene un gran número de aplicaciones y propósitos (Ej. Predicción de la pose del ligando, predicción de la afinidad del ligando por el receptor, y de potenciales compuestos activos).⁵³

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Como ya es sabido, el cáncer es uno de los principales problemas de salud a nivel mundial, su incidencia es cada vez mayor además de que más de la mitad de los pacientes que padecen estas enfermedades eventualmente morirá a casusa de ellas. En específico, el cáncer de mama es el tipo de cáncer que más se diagnostica y causa la muerte de mujeres en el mundo. Aunque existen diversas opciones terapéuticas para el tratamiento de los distintos tipos de cáncer de mama y que ha aumentado el desarrollo de nuevas herramientas para la búsqueda de agentes terapéuticos, es conocido el gran número de inconvenientes que presentan los tratamientos, tales como la falta de selectividad de agentes quimioterapéuticos y por ello la cantidad significativa de efectos adversos, el desarrollo de resistencia por parte de las células cancerígenas a los agentes citotóxicos, y la poca efectividad que tienen algunos de ellos, así como la necesidad de terapias combinadas. En este sentido, nuestro grupo de investigación ha encontrado que distintos derivados de quinazolina, en específico de la quinazolin-2,4,6-triamina, presentan actividad contra líneas celulares tumorales; en particular, algunos de ellos presentan cierta selectividad contra células de cáncer de mama (MCF-7) y han demostrado tener interacciones con el receptor estrogénico (ER) en estudios de acoplamiento molecular. Por tanto, ¿Con las primeras informaciones estructurales de los derivados de quinazolina ya evaluados, será posible sintetizar nuevos derivados con potencial actividad antitumoral hacia células de cáncer de mama que expresen receptor ER para contar con moléculas de acción selectiva y con menores riesgos de ocasionar reacciones adversas?

4. HIPÓTESIS

Considerando que derivados de quinazolina con sustituyentes de tipo amida en posiciones 4 y 6 presentan actividad preferente hacia células cancerosas de glándulas mamarias, se propone una serie de nuevos derivados con las mismas características estructurales donde los sustituyentes presenten un grupo electrodonador o electroatractor en la posición 3 de su anillo aromático, que se acoplarán favorablemente al receptor estrogénico de las células malignas, por lo que al sintetizarlos y evaluarlos *in vitro* presentarán citotoxicidad contra la línea celular MCF-7.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

Sintetizar y caracterizar cuatro derivados de quinazolin-2,4,6-triamina para su evaluación en cuatro líneas celulares malignas, que incluyan a células de cáncer mamario, y en una línea celular primaria.

5.2. Objetivos particulares

- Realizar un estudio de acoplamiento molecular de las cuatro moléculas a sintetizar con el dominio de unión a ligando del receptor estrogénico (ER).
- Establecer métodos para la síntesis y purificación de los cuatro derivados de quinazolin-2,4,6-triamina que presenten en posición 4 ó 6 una benzamida, que a su vez esté sustituida en posición 3 por un grupo electroatractor o electrodonador.
- Caracterizar estructuralmente los compuestos sintetizados por medio de técnicas espectroscópicas como espectroscopía de infrarrojo (IR) y resonancia magnética nuclear (RMN).
- Enviar a evaluación los compuestos en cuatro líneas celulares de cáncer que incluyan a las células malignas de glándulas mamarias ER⁺/PR⁺, triples negativas y una línea primaria de fibroblastos.

6. METODOLOGÍA

6.1. Estudio de acoplamiento molecular (docking) de compuestos NICQ1-NICQ5

Trabajos anteriores realizados por el grupo de investigación han demostrado que derivados de quinazolina sustituidos en posición 6 presentan mayor inhibición de crecimiento en líneas celulares de cáncer de mama (MCF-7) que en otras líneas de cáncer y que pueden acoplarse con el receptor estrogénico humano; por ello, en este trabajo se realizó el estudio de acoplamiento molecular de todas las moléculas a sintetizar empleando como receptor el dominio de unión a ligando del receptor estrogénico humano.

El estudio de *docking* se hizo utilizando el programa *Autodock 4*, el cual está conformado a su vez por dos programas principales: *Autodock*, que realiza el *docking* de la molécula con un grupo de mallas o *grids* que describen la estructura del receptor y son generadas por el programa *Autogrid*. *Autodock* es útil para encontrar la conformación de mínima energía del ligando en el receptor. Una vez que se realizó el cálculo y *docking* de las moléculas, el resultado fue observado a través del programa *PyMOL*, el cual es un visualizador de moléculas frecuentemente usado para generar imágenes de estructuras moleculares y con funciones para ver estructuras 3D útiles para el diseño de fármacos basado en la estructura.⁵³

6.1.1. Preparación de la proteína (molécula receptora)

El receptor se obtuvo del banco de proteínas en Protein Data Bank (PDB) con ID 1ERR. Para prepararlo, se eliminaron las moléculas de agua y del compuesto con lector de texto para abrir el archivo PDB y *Autodock Tools-1.5.6*.

Se agregaron los hidrógenos susceptibles de formar puentes de hidrógeno y cargas parciales Gasteiger (para lo que únicamente se requiere el conocimiento de la topología de la molécula) empleando el software *Autodock Tools-1.5.6*.

6.1.2. Preparación de la molécula ligando

Las cinco moléculas derivadas de quinazolina se construyeron empleando el programa *Spartan '02*. Posteriormente, usando *Autodock 4* se determinó el átomo que es la mejor raíz de cada una de las moléculas; la porción rígida de las mismas, incluye al átomo raíz y a todos los átomos unidos a la raíz por medio de enlaces no rotables. Luego, se determinó qué enlaces pueden rotar y qué enlaces no son rotables.

6.1.3. Docking molecular

Para el cálculo se empleó la versión de *Autogrid 4*, en específico, esto permitió generar el *grid*, los distintos tipos de mapas con su tamaño y localización. Un mapa es calculado para cada elemento del ligando y su mapa electrostático, el tipo de mapas a generar depende del tipo de átomos en el ligando. En el caso de los cinco derivados de quinazolina se generaron mapas para cada tipo de átomo que formaba a las moléculas.

Para el acoplamiento se usó en *Autodock 4* un algoritmo de tipo Lamarckiano con una población de 150 y 2,500,000 evaluaciones. En todos los casos se consideró que el mejor acoplamiento era aquel que tenía la conformación de menor energía.

Para visualizar los resultados se utilizó el programa *PyMOL viewer* en donde fue posible visualizar la estructura de las moléculas acopladas con el receptor estrogénico (IDpdb:1ERR) en la conformación de menor energía.

6.2. Síntesis química de derivados de quinazolina

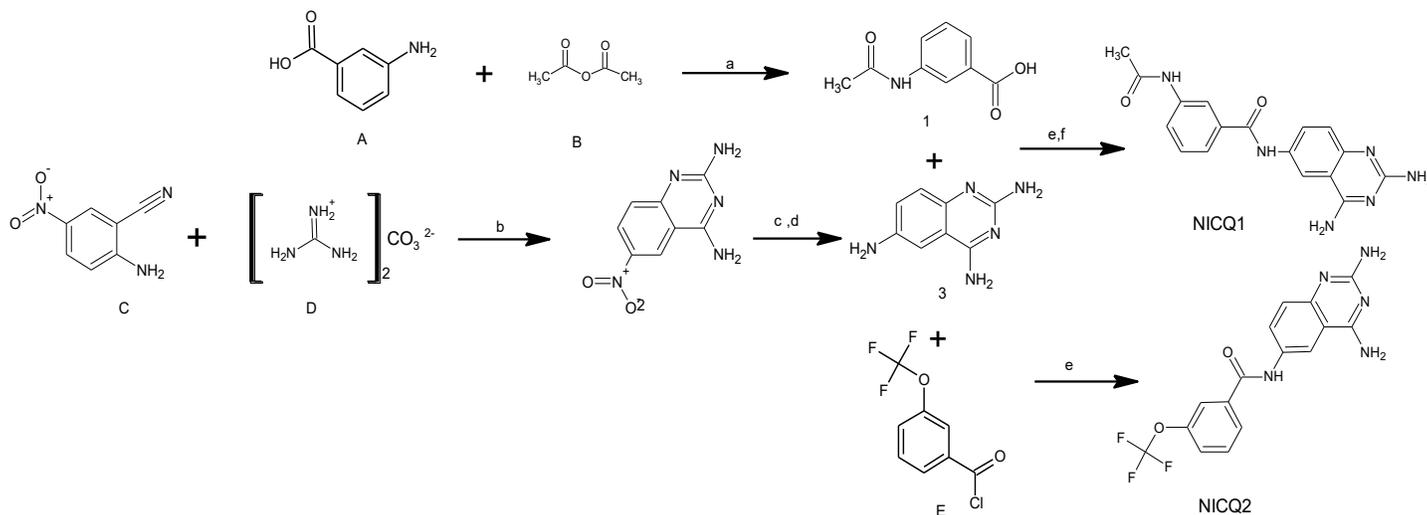
A continuación, se presenta una breve descripción de los pasos que fueron necesarios para la síntesis y purificación de los derivados de quinazolina **NICQ1-NICQ5** propuestos en los objetivos junto con sus respectivos intermediarios. El procedimiento detallado que se desarrolló para la obtención de los mismos se encuentra en el Apéndice I.

6.2.1 Síntesis de derivados de quinazolin-2,4,6-triamina sustituidos con benzamidas en posición 6

6.2.1.1 Síntesis de 3-(acetilamino)-*N*-(2,4-diaminoquinazolin-6-il)benzamida (NICQ1) y *N*-(2,4-diaminoquinazolin-6-il)-3-(trifluorometoxi)benzamida (NICQ2)

Para la síntesis del compuesto **NICQ1** primero se realizó la acetilación del ácido 3-aminobenzoico (A) con un exceso de anhídrido acético (B), calentamiento y presencia de ácido sulfúrico. Luego, al igual que para el resto de los derivados, se sintetizó el núcleo de quinazolina ,2,4-diamino-6-nitroquinazolina (2), mediante la ciclocondensación de 2-amino-5-nitrobenzonitrilo (C) con carbonato de guanidina (D) en medio básico. Posteriormente, se realizó una hidrogenación catalítica del compuesto 2, empleando como catalizador paladio sobre carbono para así dar lugar a la quinazolin-2,4,6-triamina (3). Para formar la amida del compuesto final se empleó como agente activante del ácido del compuesto 1 el reactivo acoplante hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-oxitripirrolidinofosfonio, (PyBOP) en presencia de trietilamina (TEA) y usando acetonitrilo como disolvente. Una vez que el ácido

se activó, se hizo reaccionar con el compuesto 3 a temperatura ambiente y con agitación constante. Para su purificación se realizó cromatografía preparativa.



a: H₂SO₄ b: KOH c: H₂ d: Pd/C e: TEA f: PyBOP

Esquema 1. Ruta sintética para los compuestos **NICQ1** y **NICQ2**.

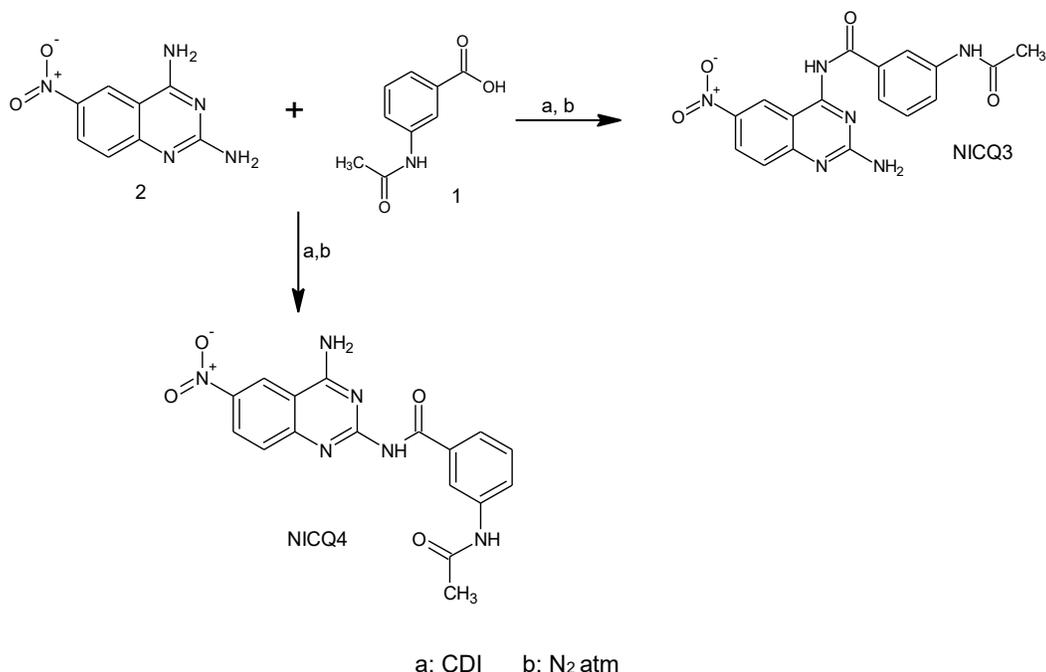
Para sintetizar el compuesto **NICQ2** se hizo reaccionar la quinazolin-2,4,6-triamina con cloruro de 3-(trifluorometoxi)benzoilo (E) en un baño de hielo en presencia de trietilamina (TEA) y empleando como disolvente acetonitrilo. Para la purificación del compuesto se empleó carbón activado y recristalización con diclorometano.

6.2.2. Síntesis de derivados de 6-nitroquinazolin-2,4-diamina sustituidos con benzamidas en posición 2 ó 4

6.2.2.1. Síntesis de 3-(acetilamino)-N-(2-amino-6-nitroquinazolin-4-il)benzamida (NICQ3), 3-acetilamino-N-(4-amino-6-nitroquinazolin-2-il)benzamida (NICQ4), y de N-(2-amino-6-nitroquinazolin-4-il)-3-metoxibenzamida (NICQ5)

Para la preparación de los tres compuestos, primero, se sintetizó el núcleo de quinazolina, 6-nitroquinazolin-2,4-diamina (2), mediante la ciclocondensación de 2-amino-5-nitrobenzonitrilo (C) con carbonato de guanidina (D) en medio básico. Luego, para el caso específico del compuesto **NICQ3** se realizó la reacción de activación del ácido 3-acetamido benzoico (1) con 1,1'-carbonildiimidazol (CDI) en condiciones anhidras, empleando atmósfera de nitrógeno y acetonitrilo anhidro como disolvente. Una vez realizada la

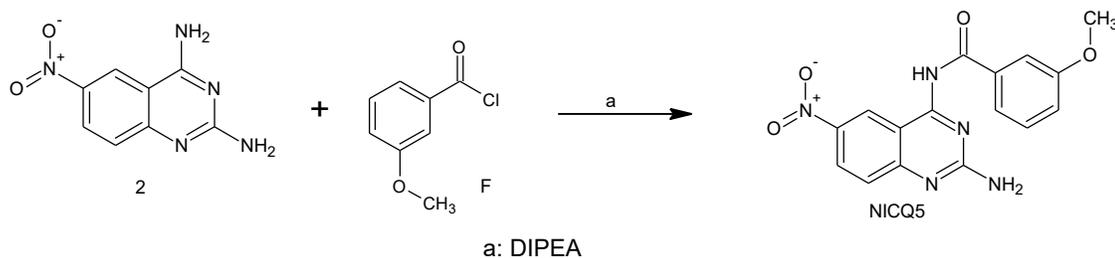
activación, el intermediario no fue aislado sino que inmediatamente se hizo reaccionar con la 6-nitroquinazolin-2,4-diamino (2) en condiciones anhidras, con atmósfera de nitrógeno y acetonitrilo como disolvente. Se purificó con recristalización con acetonitrilo.



Esquema 2. Ruta sintética para los compuestos **NICQ3** y **NICQ4**.

En lo que respecto al compuesto **NICQ4**, de igual forma que para el compuesto **NICQ3**, la primera reacción que se realizó fue la activación del ácido 3-acetamidobenzóico con 1,1'-carbonildiimidazol (CDI) en condiciones anhidras, con atmósfera de nitrógeno y empleando acetonitrilo como disolvente, una vez que se ya se había activado el ácido, éste intermediario se hizo reaccionar con la 6-nitroquinazolin-2,4-diamina (2) que previamente fue disuelta en dimetilformamida (DMF). Se dejó reaccionar en condiciones anhidras y atmósfera de nitrógeno

Por otra parte, para el compuesto **NICQ5** se hizo reaccionar la 6-nitroquinazolin-2,4-diamina (2) con el cloruro de 3-metoxibenzoilo (F) en presencia de N-N'-diisopropiletilamina (DIPEA), un baño de hielo y usando acetonitrilo como disolvente. Se purificó por medio de una percolación con gel de sílice y usando como disolventes cloroformo y metanol.

Esquema 3. Ruta sintética para el compuesto **NICQ5**

6.3. Evaluación biológica de los compuestos NICQ1-NICQ5

A continuación, se describen, de forma general, los procedimientos experimentales que fueron empleados para la evaluación biológica de los compuestos sintetizados.

6.3.1. Preparación de líneas celulares

Las líneas celulares empleadas para la evaluación de los compuestos fueron: MCF-7 (cáncer de mama ER⁺), MDA-MB-231 (cáncer de mama triple negativo), PC-3 (cáncer de próstata), HCT-15 (cáncer de colon), FGH (fibroblastos gingivales humanos/cultivo primario de células sanas). Estas líneas, se cultivaron en el medio de cultivo RPMI-1640 suplementado con suero fetal bovino (10%) y una mezcla de antibióticos-antimicótico. Posteriormente, en cada micro-placa de 96 pozos se depositaron tres líneas celulares por duplicado; se colocó un volumen de 100 μ L por pozo con densidad de inóculo dependiendo de la línea celular (5.0, 7.5, 10.0 $\times 10^4$ células/ mL). Las placas se incubaron por 24 h a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂, para favorecer que las células se adhirieran al fondo de la placa.

6.3.2. Preparación del screening primario (escrutinio primario)

Los compuestos fueron disueltos en la cantidad necesaria de dimetilsulfóxido (DMSO) para alcanzar una concentración de 20 μ M, luego se tomó una alícuota de esta solución, denominada solución stock y se diluyó en medio de cultivo suplementado. Posteriormente, en las micro-placas se agregaron 100 μ L de la solución con el compuesto a probar, de forma que quedó a una concentración final de 50 μ M. Después, la micro-placa se incubó durante 48 h bajo las condiciones mencionadas previamente en el punto anterior.

Al finalizar el periodo de incubación, las células se fijaron *in situ* añadiendo una solución de ácido tricloroacético frío al 50% y fueron incubadas nuevamente, pero esta vez a 4°C durante 60 min. Se desechó el sobrenadante de las micro-placas, se lavaron 5 veces con agua y se secaron a temperatura ambiente.

6.3.3. Teñido celular

El teñido de células que se fijaron al pozo se efectuó añadiendo 100 µL de una solución al 0.4% de sulforrodamina B (SRB). Después de agregar la solución las placas se incubaron por 30 min a temperatura ambiente. La SRB no unida es removida con lavados de ácido acético al 1% y se dejaron secar a temperatura ambiente. Una vez que las placas estuvieran secas, se añadieron 100 µL de un buffer de TRIS y se agitó por 10 min para favorecer la disolución de complejo. Luego, se midió la densidad óptica (DO) en un lector de micro-placas a una longitud de onda de 515 nm. Los datos fueron procesados empleando el promedio de la DO de 2 pozos/línea celular tratados con el compuesto (DOt), los dos pozos tratados únicamente con DMSO (DOc), y 2 pozos testigo, es decir sin línea celular, pero si compuesto (DOb). El porcentaje de inhibición de crecimiento (%IC) se calculó con la expresión: $\%IC = 100 - (DOt - DOb / DOc - DOb) * 100$.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1. Estudios de acoplamiento molecular de los compuestos NICQ1-NICQ5

Se realizó el estudio de acoplamiento molecular de los cinco compuestos sintetizados con el receptor estrogénico humano, específicamente con el dominio de unión a ligando del ER- α , con la finalidad de observar las interacciones teóricas presentes y asociarlas con la presencia o ausencia de actividad citotóxica. Todos los acoplamientos se obtuvieron haciendo uso del software *Autodock Tools-1.5.6*, y para la visualización de los acoplamientos se empleó el programa *PyMOL*. A continuación, se presentan algunos datos calculados con *Autodock Tools-1.5.6* al hacer los acoplamientos.

Tabla 5. Datos de energía libre de unión y posibles interacciones de cada compuesto con el ER- α obtenidos de los acoplamientos.

Compuesto	Energía de unión ΔG (Kcal/mol)	Aminoácidos con interacciones
NICQ1	-7.56	Lys520, Met522, Glu523, Val422, Ile424
NICQ2	-6.81	Tyr526, Glu523, Trp383
NICQ3	-8.01	Lys520, Glu380, His516
NICQ4	-7.22	Tyr526
NICQ5	-7.57	Glu380, His377, Lys520, His516

A continuación, se presentan los acercamientos a 12 Å (Angstrom) de los acoplamientos de cada compuesto con el receptor estrogénico, las interacciones teóricas y la estructura 2D de cada compuesto.

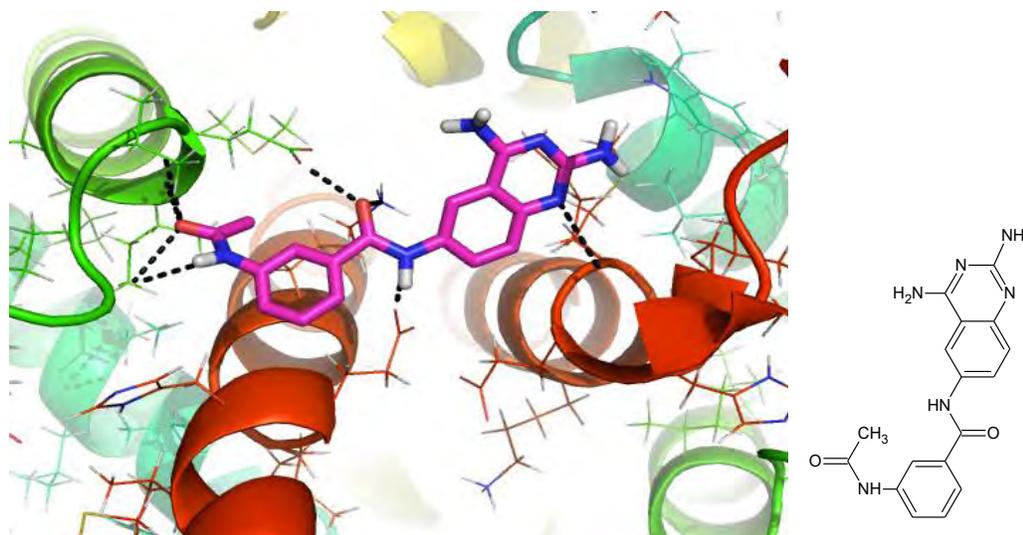


Figura 14. Visualización de las interacciones del compuesto **NICQ1** con el dominio de unión a ligando del receptor estrogénico alfa humano (ER- α) y estructura 2D del compuesto **NICQ1**.

Es posible notar que el compuesto **NICQ1** teóricamente presenta 6 interacciones tipo puente de hidrógeno con el receptor. En específico, se observa la formación de un puente de hidrógeno entre el nitrógeno del núcleo de quinazolina en posición 1 con el residuo de metionina 522, un puente de hidrógeno entre el hidrógeno unido al nitrógeno de la amida formada en posición 6 del núcleo de quinazolina y el residuo de ácido glutámico 523, un puente de hidrógeno formado entre el oxígeno del grupo carbonilo de la amida en posición 6 y el residuo de lisina 520, también se observan otras dos interacciones de tipo puente de hidrógeno formadas entre el oxígeno del carbonilo de la amida que se encuentra en

posición 3 del anillo aromático de la benzamida con el residuo de isoleucina 424. Finalmente, se observa la formación de un puente de hidrógeno entre el residuo valina 422 y el hidrógeno unido al nitrógeno de la amida en posición 3.

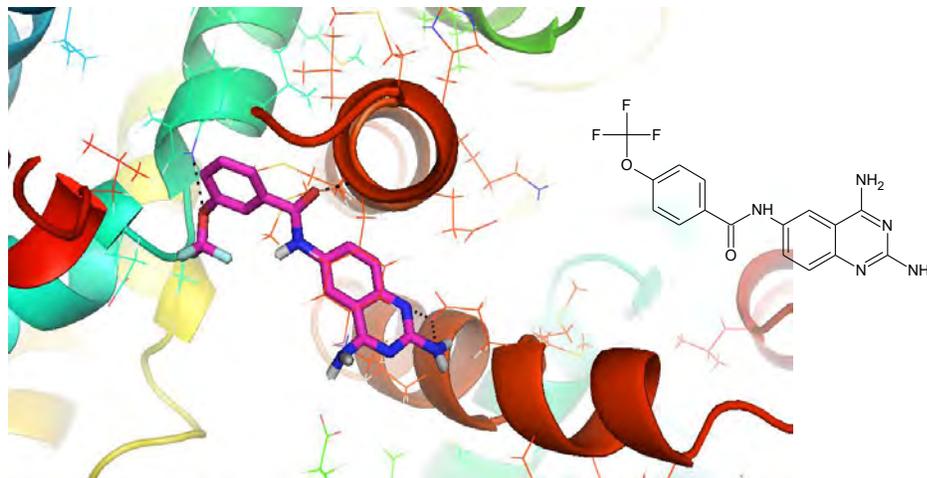


Figura 15. Visualización de las interacciones del compuesto **NICQ2** con el dominio de unión a ligando del receptor estrogénico alfa humano (ER- α) y estructura 2D del compuesto **NICQ2**.

En lo que respecta al compuesto **NICQ2** es posible notar en la figura 15 que este compuesto presenta teóricamente 3 interacciones de tipo puente de hidrógeno con el receptor. Un puente de hidrógeno se forma entre un hidrógeno unido nitrógeno de la amina en posición 2 del núcleo de quinazolina y el residuo de ácido glutámico 523, también se observa la interacción de tipo puente de hidrógeno entre el carbonilo de la amida en posición 6 del núcleo de quinazolina y el residuo tirosina 526, finalmente otro puente de hidrógeno se forma entre el oxígeno del trifluorometoxilo en posición 3 de la parte de la benzamida y el residuo triptófano 383.

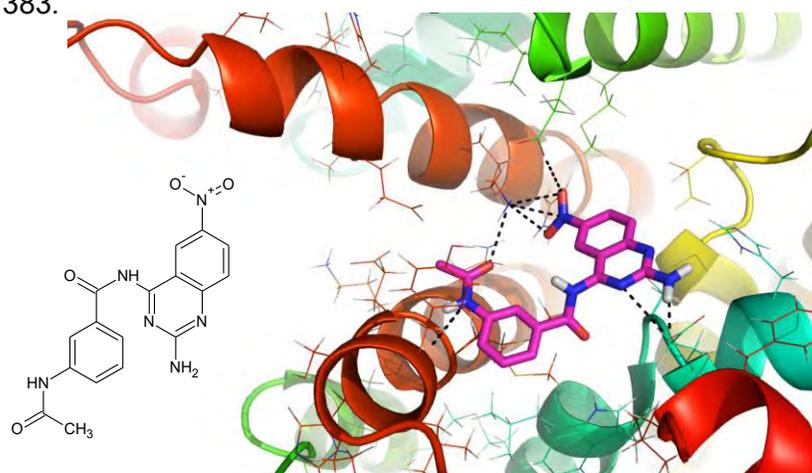


Figura 16. Visualización de las interacciones del compuesto **NICQ3** con el dominio de unión a ligando del receptor estrogénico alfa humano (ER- α) y estructura 2D del compuesto **NICQ3**.

En la figura 16 se puede notar que el compuesto **NICQ3** presenta 4 interacciones teóricas de tipo puente de hidrógeno, una de las interacciones ocurre entre el carbonilo de la amida en posición 3 en la benzamida y el residuo de lisina 520, otro puente de hidrógeno se forma entre el residuo de ácido glutámico 380 y el hidrógeno de la amina en posición 2 del núcleo de quinazolina. Por otra parte, también se puede notar interacciones de tipo puente de hidrógeno formadas entre los oxígenos del grupo nitro y los residuos de lisina 520 e histidina 516.

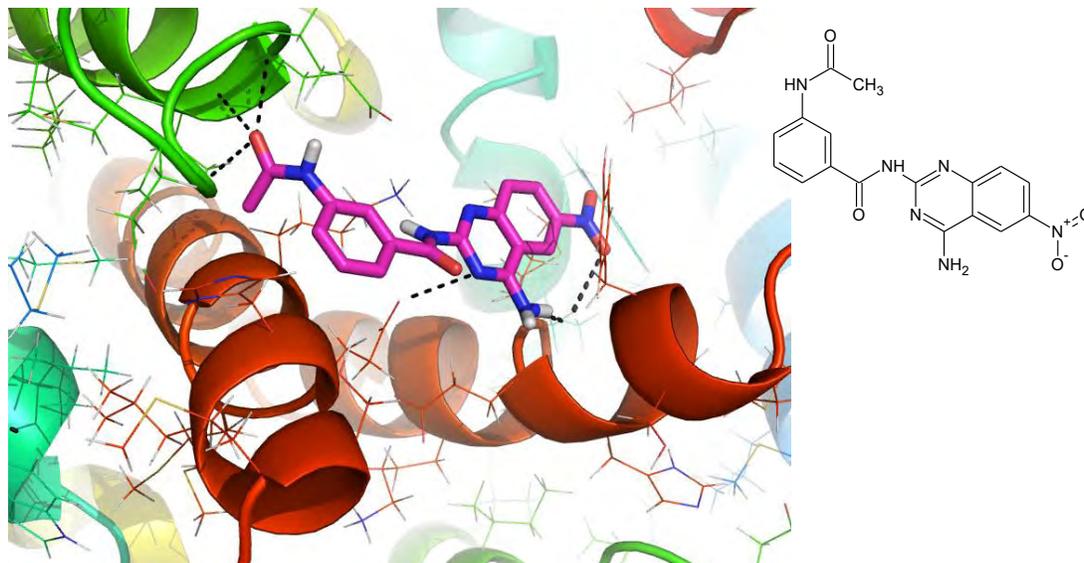


Figura 17. Visualización de las interacciones del compuesto **NICQ4** con el dominio de unión a ligando del receptor estrogénico alfa humano (ER- α) y la estructura 2D del compuesto **NICQ4**.

En el caso del compuesto **NICQ4** se presentan menos interacciones de las que se esperaban al realizar previamente el acoplamiento del compuesto **NICQ3** y observar las 4 interacciones, se piensa que es debido a que ambos compuestos adquirieron conformaciones distintas en el sitio activo. En este caso, únicamente es posible observar 2 interacciones teóricas de tipo puente de hidrógeno, una de ellas ocurre entre el residuo de tirosina 526 y el hidrógeno unido al nitrógeno del grupo amino en posición 4, otra entre el mismo residuo de tirosina 526 y un oxígeno del grupo nitro en posición 6 del núcleo de quinazolina.

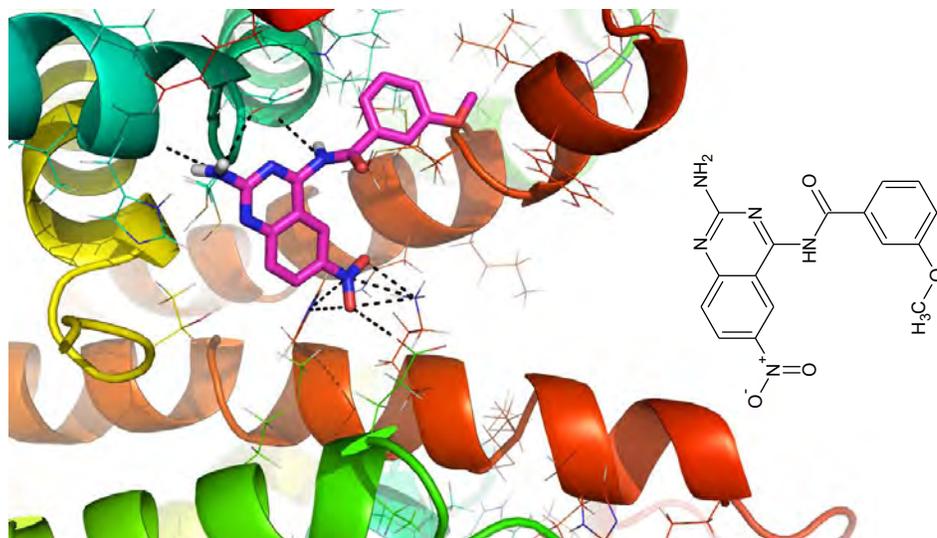


Figura 18. Visualización de las interacciones del compuesto **NICQ5** con el dominio de unión a ligando del receptor estrogénico alfa humano (ER- α) y estructura 2D del compuesto **NICQ5**.

En relación al estudio del acoplamiento del compuesto **NICQ5** es posible observar la formación de 8 interacciones de tipo puente de hidrógeno entre la molécula y el receptor, el número de interacciones resultó mayor a las del resto de los compuestos que en vez de un electrodonador, poseen un grupo electroattractor en posición 3 de la benzamida; es importante recalcar que el oxígeno del metoxilo susitado en tres teóricamente no interacciona con ningún residuo por medio de puentes de hidrógeno a diferencia de lo esperado, posiblemente, esto se debe a la conformación que adquiere al acoplarse lo que hace que el oxígeno quede a una distancia mayor a la que se pueden formar puentes de hidrógeno (2.2-4 Å).⁵⁹ La falta de una interacción con esta parte de la molécula puede llevar a pensar que la presencia del electrodonador no influye en la unión con el receptor lo cual podría expresarse con una actividad citotóxica nula, sin embargo, no hay que olvidar que pueden existir otro tipo de interacciones de naturaleza hidrofóbicas o de Van der Waals que pueden intervenir.

Se observa la formación de un puente de hidrógeno entre el residuo de ácido glutámico 380 y un hidrógeno unido al nitrógeno de la amida en posición 4 del núcleo de quinazolina, también se observa la formación de un puente de hidrógeno entre el residuo de la histidina 377 y el hidrógeno aceptor del grupo amino en posición 2 del núcleo de quinazolina; el resto de los puentes de hidrógeno se forman entre los oxígenos y el nitrógeno del grupo nitro con los residuos de lisina 520 e histidina 516.

Debido a que todos los compuestos sintetizados se acoplaron con receptor estrogénico alfa en los estudios de acoplamiento molecular en el mismo sitio que uno de los derivados de

quinazolina con actividad citotóxica reportada (Figura 19), se podría pensar que todos presentarán actividad citotóxica en la línea MCF-7 (ER⁺), ya que, en mayor o menor grado no permitirán la unión de algún estrógeno con el receptor y por tanto la célula morirá. Sin embargo, hay que recordar que estos son estudios teóricos basados en cálculos por lo que no garantiza que todos los compuestos presentarán actividad. En este sentido, moléculas que presentan un mayor número de interacciones teóricas en los acoplamientos moleculares con el receptor son las de los compuestos **NICQ1**, **NICQ3** y **NICQ5** esto permite pensar que los tres compuestos presentarán la mayor actividad.

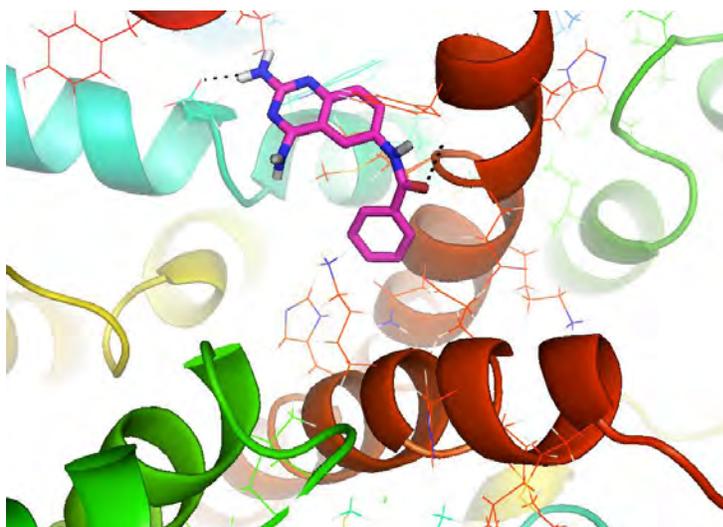


Figura 19. Visualización del acoplamiento molecular de un derivado de quinazolina sustituido en 6 con una benzamida sin sustituyente en 3 que fue previamente sintetizado y con actividad citotóxica reportada con el receptor estrogénico alfa humano (ER- α)

7.2. Síntesis y caracterización de derivados de quinazolina

En la siguiente tabla se muestran algunas características y propiedades de los intermediarios y compuestos finales sintetizados.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 6. Características generales de intermediarios y compuestos finales sintetizados.

Compuesto	Aspecto	R.f.	Sistema de elución	P.f (°C)	Rendimiento (%)
1	Sólido color blanco	0.20	II	244.3-245.7 P.d.	53.2
2	Sólido color naranja	0.46	III	364.1-366.3 P.d.	71.6
3	Sólido color café	0.1	I	255.1-253.2 P.d.	45.9
NICQ1	Sólido color amarillo claro	0.56	I	322.4-324.5 P.d	6.4
NICQ2	Cristales color naranja	0.30	I	355.4-357.1 P.d	41.2
NICQ3	Sólido color amarillo	0.40	III	223.2-224.5	22.9
NICQ4	Líquido de aspecto resinoso color naranja	0.66	III	Nd	33.5
NICQ5	Sólido color amarillo	0.58	II	245.2-246.6	15.8

P.f. Punto de fusión. A menos que se especifique P.d. Punto de descomposición.

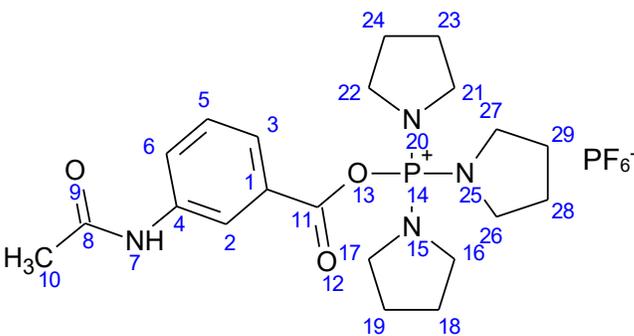
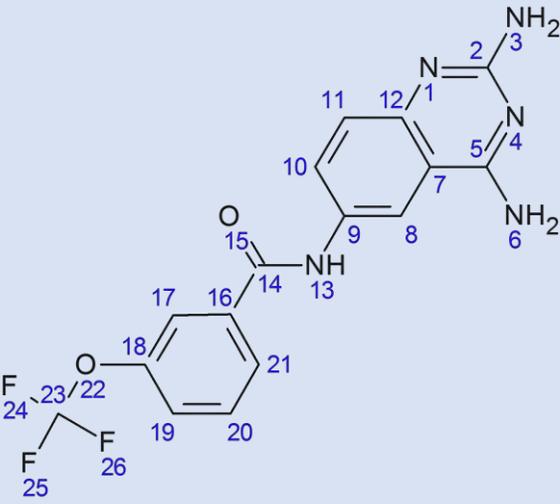
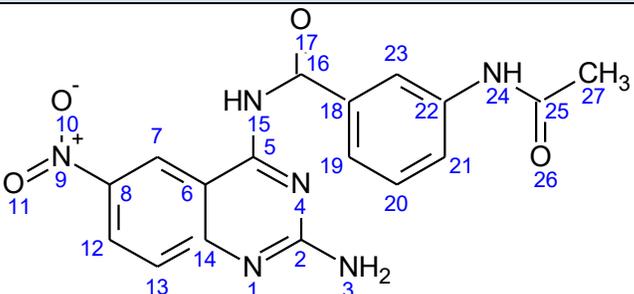
R.f. Factor de retención en la placa de cromatografía en capa fina.

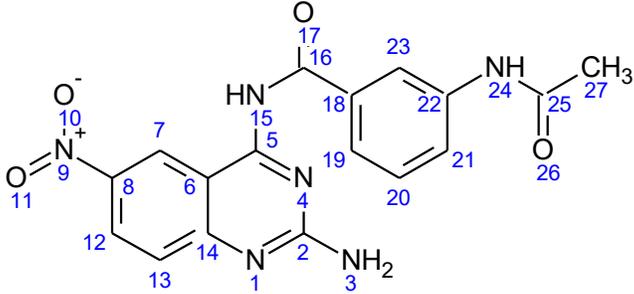
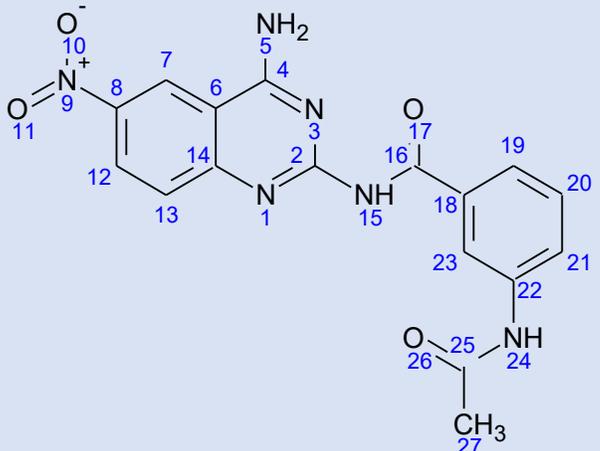
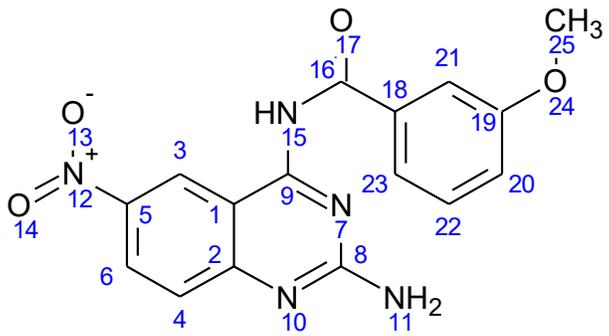
Para confirmar que la estructura de los compuestos sintetizados se realizó la caracterización de los mismos por medio de dos técnicas espectroscópicas: espectroscopía infrarroja y resonancia magnética nuclear ^1H .

Para fines prácticos de interpretación se presenta la siguiente tabla en la que se muestra la estructura propuesta de cada compuesto (**NICQ1-NICQ5**) y los datos espectroscópicos obtenidos después de enviar los compuestos a evaluar por medio de las técnicas de caracterización:

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 7. Estructura de los compuestos sintetizados y datos espectroscópicos obtenidos de IR y RMN-¹H.

Compuesto	Datos espectroscópicos
 <p style="text-align: center;">NICQ1</p>	<p>IR (FTIR por reflectancia ATR / cm⁻¹): 3145.61 (Ar-CO-NH-R), 3313.40 (N-H amina), 1654.64 (C=O), 1486.62, 1689.86 (C=C)</p> <p>RMN- ¹H (400 MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): 1.72[(H₁₈)(H₁₉)(H₂₃)(H₂₄)(H₂₈)(H₂₉)(d, J= 0.4 Hz, 6H)], 2.05 [(H₁₀)(s,3H)], 3.0 [(H₁₆)(H₁₇) (H₂₁)(H₂₂)(H₂₆)(H₂₇) (d, J=3.9 Hz, 6H)], 7.42 [(H₅)(t, J=10.9-orto, 1H)], 7.81 [(H₃)(ddd, J=8.1-orto, 2.2, 1.1-meta Hz, 1H)], 7.60 [(H₆)(dd, J=7.8-orto, 1.6-meta Hz, 1H)], 8.24 [(H₂)(t, J= 1.8 -meta, 1H)], 10.16 [(H₇)(s,1H)].</p>
 <p style="text-align: center;">NICQ2</p>	<p>IR (FTIR por reflectancia ATR / cm⁻¹): 3104.55 (Ar-CO-NH-R), 3439.36, 3463.66 (N-H amina), 1613.90, 1582.41, 1459.79, 1478.35 (C=C aromático), 1658.82 (C=N), 1291.43 (-CF₃)</p> <p>RMN- ¹H (400 MHz, DMSO-d₆), δ (ppm): 0.64 [(H de metilos de cloruro de trietilamonio) (t, J=7.3 Hz, 9H)], 2.00 [(H de metilenos de cloruro de trietilamonio) (s, 6H)], 7.41 [(H₂₀)(t, J=8.54-orto, 1H)], 7.49 [(H₂₁)(ddd, J=7.9-orto, 1.2,1.1-meta, 1H)], 7.53 [(H₁₇)(t, J= 2.1-meta, 1H)], 7.71 [(H₁₉)(dd, J=10.81-orto, 1.1-meta, 1H)], 7.85 [(H₁₃)(s, 1H)], 7.98 [(H₈)(s, 1H)], 8.07 [(H₁₀)(d, J=8.2-orto, 1H)]</p>
 <p style="text-align: center;">NICQ3</p>	<p>IR (FTIR por reflectancia ATR / cm⁻¹): 3333.87 (Ar-CO-NH-R), 3116.86, 3145.02 (N-H amina), 1550.82 (C=O), 1609.49, 1485.80 (C=C aromático), 1662.04 (C=N), 1369.33 (Ar-NO₂)</p>

 <p style="text-align: center;">NICQ3</p>	<p>RMN- ^1H (400 MHz, DMSO-d_6), δ (ppm):</p> <p>2.03 [(H₂₇)(s, 3H)], 6.99 [(H₂₄)(s, 1H)], 7.37 [(H₂₀)(d, J=7.9-orto, 1H)], 7.43 [(H₁₉)(ddd, J=8.4-orto, 4.1, 3.1- meta, 1H)], 7.57 [(H₂₁)(ddd, J=4.1, 3.3, 2.2 - meta, 1H)], 7.61 [(H₂₃)(dd, J=4.8, 3.6- meta, 1H)], 7.76 [(H₇)(s, 1H)], 8.17 [(H₁₂)(t, J=1.8-meta, 1H)], 8.22 [(H₁₃)(t, J=7.6-orto, 1H)], 10.12 [(H₁₅)(s, 1H)]</p>
 <p style="text-align: center;">NICQ4</p>	<p>IR (FTIR por reflectancia ATR / cm^{-1}):</p> <p>3122.25 (Ar-CO-NH-R), 1607.51, 1483.18(C=C aromático), 1551.81 (C=O), 1667.58 (C=N), 1371.90 (Ar-NO₂)</p> <p>RMN- ^1H (400 MHz, DMSO-d_6), δ (ppm):</p> <p>2.0 [(H₂₇) (s, 3H)], 7.02 [(H₂₄) (s, 1H)], 7.38 [(H₂₁) (t, J=7.9-orto, 1H)], 7.60 [(H₁₉) (dd, J= 6.5- orto, 1.2-meta, 1H)], 7.65 [(H₇) (s, 1H)], 7.78 [(H₁₂) (d, J= 1.1-meta, 1H)], 8.19 [(H₁₃) (s, 1H)], 10.10 [(H₁₅) (s, 1H)]</p>
 <p style="text-align: center;">NICQ5</p>	<p>IR (FTIR por reflectancia ATR / cm^{-1}):</p> <p>3073.63 (Ar-CO-NH-R), 3008.78 (N-H amina), 1685.49 (C=O), 1581.87, 1603.35, 1487.53. 1464.43 (C=C aromático)</p> <p>RMN- ^1H (400 MHz, DMSO-d_6), δ (ppm):</p> <p>3.70 [(H₂₅) (s, 3H)], 7.07 [(H₂₂) (s, 1H)], 7.36 [(H₂₀) (s, 1H)], 7.39 [(H₂₃) (d, J=7.1-orto, 1H)], 7.41 [(H₂₁) (dd, J= 3.7, 2.2 -meta, 1H)], 7.8 [(H₃) (s, 1H)], 7.91 [(H₆) (d, J= 2.1-meta, 1H)], 8.10 [(H₄) (d, J= 7.4-orto, 1H)]</p>

* Para facilitar el análisis a cada átomo de cada compuesto se le asignó un número, este no corresponde con la numeración para la nomenclatura de los compuestos.

7.2.1. Síntesis y caracterización del compuesto 3-(acetilamino)-N-(2,4-diaminoquinazolin-6-il)benzamida (NICQ1)

Para la síntesis del compuesto **NICQ1** primero se realizó la acetilación de una de las materias primas, es decir, el ácido 3-aminobenzoico (A), mediante una reacción de solvólisis con anhídrido acético (B). Se dice que la reacción es de solvólisis cuando uno de los componentes funciona como disolvente y reactivo a la vez. En este caso, un exceso de anhídrido acético permitió la completa disolución del ácido 3-aminobenzoico y la acetilación del grupo amino en posición 3. En un inicio, esta reacción se realizó a temperatura ambiente, con agitación constante y sin presencia de ácido sulfúrico, sin embargo, fue posible notar que a temperatura ambiente la mayor parte del ácido 3-aminobenzoico no se disolvió y, por tanto, no reaccionaba por completo, de manera que se decidió agitar la mezcla de reacción en una parrilla con baño de aceite a 70°C (temperatura menor a la de ebullición del anhídrido acético 139°C) y agregar una gota de ácido sulfúrico concentrado para favorecer la reacción. Es importante hacer énfasis en que se debía añadir una cantidad de ácido sulfúrico que no hidrolizara al anhídrido acético y que no protonara el grupo amino del ácido 3-aminobenzoico lo cual, le quitaría el carácter nucleofílico al mismo. Se adaptó un condensador para reflujo al sistema de reacción, y la mezcla se dejó reaccionar con agitación y calentamiento. La reacción se monitoreó con cromatografía en placa fina (ccf), al término se dejó enfriar y se midió el pH de la mezcla que se esperaba que fuera ácido. Como sería muy difícil evaporar el anhídrido acético aún a presión reducida debido a su elevado punto de ebullición, se decidió hacer una extracción (AcOEt: H₂O). Como la mezcla final tenía pH ácido, el grupo hidroxilo del ácido estaría protonado y por tanto el producto ácido 3-acetilaminobenzoico (1) tiene una mayor afinidad por la fase orgánica. Con la finalidad de tener un mayor rendimiento, se realizaron 3 extracciones, se colectó la fase orgánica y el acetato de etilo se evaporó a presión reducida. Al finalizar, se obtuvo un sólido color blanco. Posteriormente, se realizó la formación del núcleo de quinazolina, es decir la síntesis de la 2,4-diamino-6-nitroquinazolina (2). Para ello se llevó a cabo una reacción de ciclocondensación en medio básico entre el 2-amino-5-nitrobenzonitrilo (C) y carbonato de guanidina (D). La reacción se llevó a cabo con agitación constante y reflujo a 90°C empleando como disolvente una mezcla PrOH/EtOH (15:5). La reacción se monitoreó con cromatografía en capa fina y al finalizar, el producto se filtró al vacío en caliente y se limpió con agua y metanol. Se obtuvo un sólido color naranja.

Para la formación de la quinazolin-2,4,6-triamina (3) se realizó una reducción catalítica del compuesto 2 en presencia de hidrógeno empleando como catalizador Pd/C y aproximadamente 500 mL de metanol como disolvente, al término de la reacción se eliminó el catalizador por filtración con embudo de vidrio poroso y se concentró el disolvente (MeOH) a presión reducida para así dar lugar a un líquido de aspecto resinoso color café, sin embargo, con la finalidad de optimizar el proceso, se realizó otro intento con una menor cantidad de disolvente pero manteniendo constante la cantidad de compuesto 2, catalizador y el tiempo de reacción. Al finalizar la reacción, eliminar el catalizador y concentrar el disolvente a presión reducida se obtuvo un sólido color café.

Finalmente, para la formación de la amida entre el compuesto 1 y el compuesto 3 para dar lugar al compuesto **NICQ1** fue necesario emplear un agente activante del ácido presente en el compuesto 1 que permitiera formar un buen grupo saliente, ya que el hidroxilo del ácido no lo es, de esta manera el carbono del ácido sería susceptible al ataque nucleofílico por parte de la amina en posición 6 del compuesto 3. Es importante mencionar que los grupos amino en posición 2 y 4 no se acetilaron para protegerlos y evitar la formación de la amida en esas posiciones debido a que al momento de eliminar los grupos acetilo de estas posiciones también se rompería el enlace formado previamente en el compuesto 1.

El agente activante que se empleó en esta reacción fue el PyBOP (hexafluorofosfato de benzotriazol-1-iloxitripirrolidinofosfonio) debido a que se ha reportado que la activación es rápida y se obtienen buenos rendimientos.⁶¹

La reacción se monitoreó por medio de cromatografía en capa fina (ccf) y al término se intentó purificar el producto por recristalización con acetonitrilo y percolación con gel de sílice y MeOH: CHCl₃, como ninguna de estas técnicas resultó se realizó una cromatografía preparativa en la cual se obtuvieron dos posibles compuestos, sin embargo, uno de ellos no se obtuvo en cantidad suficiente para ser caracterizado ni evaluado, se piensa que probablemente se trataba de otro compuesto que resultó de la formación de una amida entre el compuesto 1 y 3 pero en posición 2 ó 4 y que estaba en una menor cantidad que el compuesto **NICQ1**, lo cual podría indicar que el nitrógeno del grupo amino en posición 6 del compuesto quinazolin-2,4,6-triamina es más nucleofílico que los otros dos. Al finalizar, el compuesto retenido en la sílice se disolvió en metanol y el disolvente se concentró a presión reducida para dar lugar a un sólido amarillo del que se obtuvieron los espectros de infrarrojo y resonancia magnética nuclear de protón para confirmar que el compuesto obtenido tenía la estructura propuesta.

El espectro de infrarrojo muestra una banda en 3145.61 cm^{-1} característica del estiramiento N-H del grupo amida, una banda en 3313.40 cm^{-1} propia del estiramiento simétrico y asimétrico de aminas terciarias, otra banda en 1654.64 cm^{-1} indica el estiramiento C=O del grupo carboxilo de la amida. Finalmente, las bandas en 1486.62 , 1689.86 cm^{-1} indican las vibraciones de estiramiento de enlaces C=C aromáticos.

El espectro de RMN- ^1H mostró señales que no correspondieron con las esperadas para el anillo de quinazolina unido a una benzamida (estructura propuesta para el compuesto **NICQ1**), pero si con el intermediario después de la activación del ácido 3-acetamidobenzoico con PyBOP, cuya estructura se muestra en la tabla 7. En el espectro es posible observar un doblete con un desplazamiento de 1.72 ppm, una constante de acoplamiento de 0.4 Hz que integra para 6 protones correspondientes a H₁₈, H₁₉, H₂₃, H₂₄, H₂₈ y H₂₉, una señal en 2.05 ppm corresponde a un singulete que integra para tres protones correspondientes a H₁₀, en 3.0 ppm es posible observar un doblete que integra para 6 protones correspondientes a H₁₆, H₁₇, H₂₁, H₂₂, H₂₆, H₂₇.

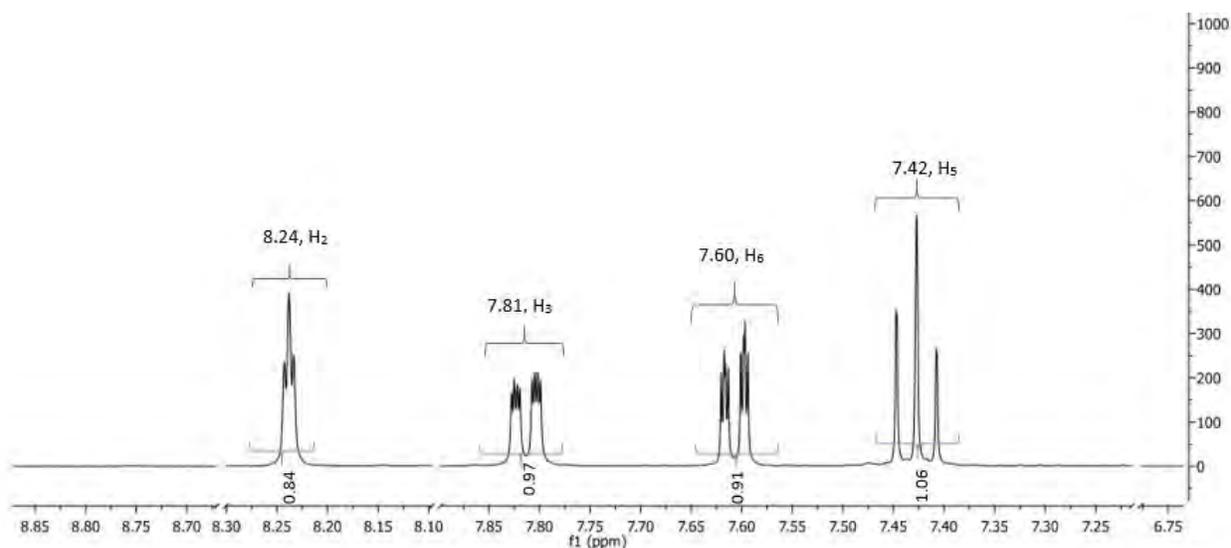


Figura 20. Ampliación de la región aromática del espectro de RMN- ^1H del compuesto **NICQ1**

En cuanto al anillo aromático, en 7.42 ppm se encuentra un triplete que integra para un protón correspondiente a H₅ con constante de acoplamiento en orto de 10.9 Hz, también en 7.60 ppm hay un doble de doble de dobles con constantes de acoplamiento en orto de 7.8 Hz y en meta de 1.6 y 1.1 Hz que integra para 1 protón y corresponde a H₆ además, se encuentra una señal correspondiente a otro doble de dobles con un desplazamiento de 7.81 y constantes de acoplamiento en orto 8.1 Hz y en meta 2.2 Hz del protón H₃, otra señal en 8.24 ppm corresponde a un triplete que integra para un protón con constante de

acoplamiento en meta de 1.8 Hz para H₂, finalmente hay un singulete con un desplazamiento de 10.16 ppm que integra para un protón y corresponde al H de la amida H₇. Una banda más es observada entre 3.0 y 3.5 ppm que se piensa corresponde a la señal de la mezcla de disolventes agua y dimetilsulfoxido- d₆.

A pesar de todos los esfuerzos realizados para la síntesis y purificación del compuesto, de acuerdo con los dos métodos empleados para la caracterización de **NICQ1**, el compuesto obtenido fue distinto al esperado. Las señales de RMN-¹H permiten proponer que la estructura del compuesto obtenido sea la indicada en la Tabla7, el cual es el intermediario formado después de la activación del ácido 3-acetilaminobenzóico con PyBOP, sin embargo, es necesario hacer otros estudios de caracterización tales como espectrometría de masas y resonancia magnética nuclear de carbono.

Se piensa que no fue posible obtener el compuesto deseado debido a que el poder nucleofílico de la amina en posición 6 de la 2,4,6-triaminoquinazolina no fue el suficiente para atacar el carbono unido al carbonilo a pesar de tener un buen grupo saliente (tripirrolidinfosonio), se cree que podrían emplearse otras alternativas para la síntesis de este compuesto que hagan uso de un aumento de temperatura.

7.2.2. Síntesis y caracterización del compuesto N-(2,4-diaminoquinazolin-6-il)-3-(trifluorometoxi)benzamida (NICQ2)

Para la síntesis del compuesto **NICQ2** se llevó a cabo una reacción de adición-eliminación entre el compuesto **3** y el cloruro de 3-(trifluorometoxi)benzoilo (E) para formar la amida, la adición del reactivo E al matraz con el disolvente se realizó en presencia de un baño de hielo y se añadió una base con la finalidad de neutralizar el cloruro de hidrógeno resultante. En este caso no fue necesario hacer uso de un agente activante pues el cloruro si es un buen grupo saliente. El monitoreo de la reacción se hizo por cromatografía en capa fina (ccf), y una vez que ésta terminó se purificó con carbón activado para eliminar algunas impurezas presentes y el compuesto final se recristalizó de la mezcla resultante con diclorometano. Con la finalidad de optimizar el proceso de purificación y obtener un mayor rendimiento se intentó recristalar también con cloroformo y por par de disolventes CHCl₃: CH₂Cl₂, sin embargo, la cantidad de sólido obtenido era menor en ambos casos que únicamente con diclorometano. De los cristales obtenidos se registraron los espectros de infrarrojo y resonancia magnética nuclear de protón.

En lo que respecta al espectro de infrarrojo, es posible observar una banda de intensidad media de 3104.55 cm^{-1} propia del estiramiento simétrico y asimétrico entre el enlace N-H del grupo amida, también se observan dos bandas de intensidad débil de 3439.36 y 3463.66 cm^{-1} debido al estiramiento simétrico y asimétrico del enlace N-H de aminas primarias; las bandas de intensidad débil en 1613.90 , 1582.41 , 1478.35 y 1459.79 son propias de las vibraciones de estiramiento de C=C de los anillos aromáticos, la banda en 1658.82 cm^{-1} es característica del estiramiento C=N, finalmente en 1291.43 cm^{-1} y alrededor se encuentran bandas pertenecientes al estiramiento de los enlaces del carbono con los tres átomos de flúor ($-\text{CF}_3$).

El espectro de RMN- ^1H muestra en la región alifática dos señales que no corresponden a las del producto deseado, pero sí a las de la sal obtenida (cloruro de trietilamonio) al finalizar la reacción debido a la adición de la base (triethylamina). Al terminar la reacción, el producto final debió lavarse con agua para disolver la sal y así poder eliminarla, como esto no se realizó en los cristales el producto final se encuentra co-cristalizado con la sal. Se piensa que la presencia del cloruro de trietilamonio favoreció la formación de los cristales naranjas puesto que obtener cristales de los derivados de quinazolina sintetizados en el grupo de investigación ha sido muy difícil. La primera de estas señales se presenta en 0.66 ppm corresponde a un triplete con constante de acoplamiento de 7.3 que integra para los 9 protones de los tres grupos metilo que presenta el cloruro de trimetilamonio, la segunda señal se presenta en 2.00 ppm y es un singulete que integra para 6 protones.

En cuanto a la región aromática, que era en donde se esperaba encontrar todas las señales, en 7.41 ppm se encuentra un triplete con acoplamiento 8.54 Hz en orto que integra para un protón y corresponde a H_{20} , otra señal se presenta en 7.49 ppm como un doble de doble de dobles con acoplamiento de 7.9 Hz en orto, 1.2 y 1.1 en meta que integra para un protón correspondiente a H_{21} , en 7.53 ppm se encuentra un triplete con acoplamiento 2.1 Hz en meta que integra para el protón H_{17} , en 7.71 ppm hay un doble de dobles con acoplamiento de 10.81 Hz en orto y 1.1 Hz en meta que integra para un protón correspondiente a H_{19} , por otra parte, en 7.85 se presenta un singulete que integra para un protón que puede tratarse de H_{13} , en 7.98 ppm se encuentra otro singulete que integra para un protón correspondiente a H_8 , finalmente en 8.07 ppm se encuentra un doblete con acoplamiento de 8.2 Hz en orto que integra para un protón correspondiente a H_{10} .

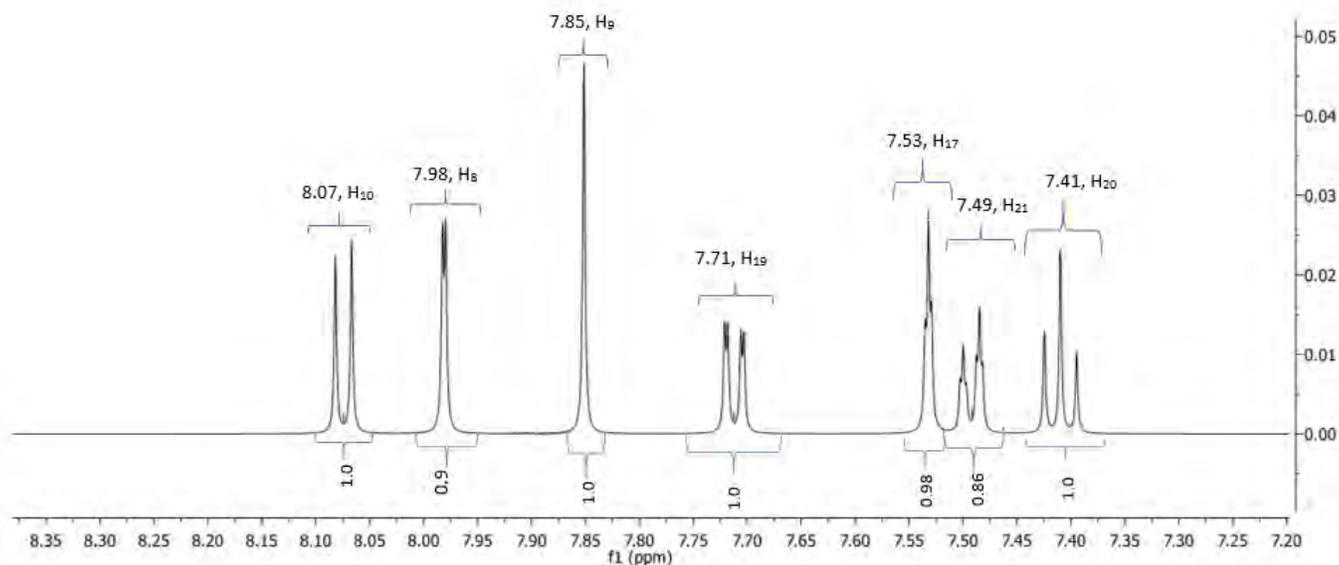


Figura 21. Ampliación de la región aromática del espectro de RMN- ^1H del compuesto NICQ2

Tomando en cuenta los resultados, es posible decir que en ambos espectros se presentan las señales que indican la presencia del compuesto deseado, sin embargo, se sugiere realizar otros estudios de caracterización como lo son RMN- ^{13}C y espectrometría de masas (EM) para complementar.

7.2.3. Síntesis y caracterización de 3-(acetilamino)-*N*-(2-amino-6-nitroquinazolin-4-il)benzamida (NICQ3)

Para la síntesis del compuesto **NICQ3** se deseaba que la formación de la amida ocurriera en posición 4 y no en la posición 6 del núcleo de quinazolina, por esta razón se empleó el compuesto 2, que en vez de un grupo amino posee un nitro en 6 que no podría reaccionar con el ácido del compuesto 1.

En este caso, si fue necesario emplear un agente activante para el ácido del compuesto 1, el agente seleccionado fue el CDI (1,1'-carbonildiimidazol) debido a que en el grupo de investigación se habían sintetizado antes derivados de quinazolina sustituidos en 2 y 4 usando CDI como acoplante. Para la síntesis se emplearon condiciones anhidras pues el CDI es muy susceptible al contacto con el agua. La primera reacción fue la activación del ácido con el CDI, esta se monitoreó con cromatografía en capa fina (ccf), una vez que se observó que el intermediario se había formado se añadió la 2,4-diamino-6-nitroquinazolina. Para eliminar la 2,4-diamino-6-nitroquinazolina sin reaccionar el disolvente de la mezcla se

concentró y se agregó una menor cantidad de acetonitrilo, lo que permitió que el compuesto 2 recristalizara y pudiera eliminarse por filtración al vacío. Después de eso, el compuesto final se obtuvo por recristalización con acetonitrilo nuevamente. Del sólido obtenido se registraron espectros de infrarrojo y resonancia magnética nuclear de protón.

En el espectro infrarrojo se observa una banda de baja intensidad en 3333.87 cm^{-1} propia del estiramiento entre N-H del grupo amida, también es posible notar dos bandas de baja intensidad en 3116.86 y 3145.02 cm^{-1} características del estiramiento simétrico y asimétrico del enlace N-H de aminas primarias; de igual forma hay una banda de intensidad media en 1550.82 cm^{-1} perteneciente al estiramiento del grupo C=O de la amida, generalmente la sustitución de un grupo alquilo (como el existente en las cetonas) por uno que tenga un átomo más electronegativo como el nitrógeno de las amidas incrementa la frecuencia a la que aparece la banda como resultado de efecto inductivo, sin embargo el par de electrones libre del nitrógeno está en resonancia con el doble enlace del carbonilo y por este efecto puede disminuir la frecuencia a la que aparece la banda. Las bandas de baja intensidad en 1609.49 y 1485.80 cm^{-1} son propias de las vibraciones de estiramiento de los enlaces C=C presentes en los anillos aromáticos, la banda en 1662.02 cm^{-1} es característica del estiramiento de enlaces C=N y finalmente, la banda en 1369.33 cm^{-1} corresponde al estiramiento asimétrico del grupo nitro unido a un anillo aromático.

En el espectro de RMN- ^1H se muestra en 2.03 ppm un singulete que integra para tres protones que corresponde a H₂₇, en 6.99 ppm hay otro singulete que integra para un protón y corresponde a H₂₄.

En el área aromática es posible observar que en 7.37 ppm hay un doblete con acoplamiento de 7.9 Hz en orto que integra para un protón correspondiente a H₂₀, en 7.43 ppm se puede observar un doble de doble de dobles con acoplamiento de 8.4 Hz en orto y 4.1, 3.1 Hz en meta que integra para el protón H₁₉, en 7.57 ppm se presenta otro doble de doble de dobles con acoplamiento de 4.1, 3.3. y 2.2 en meta que integra para uno y corresponde a H₂₁, de igual forma, en 7.61 ppm se encuentra un singulete que corresponde al protón H₁₅, otro doblete se presenta en 7.76 ppm con acoplamientos en meta de 2.2 y 1.1 Hz que integra para un protón que corresponde a H₇, para finalizar con la región aromática es posible observar dos tripletes en 8.17 y 8.22 ppm que acoplan en 1.8 Hz-meta y 7.6Hz -orto respectivamente y corresponden a los protones H₁₂ y H₁₃. Por último, en 10.12 ppm se presenta una señal como singulete que integra para un protón y que corresponde a H₁₅.

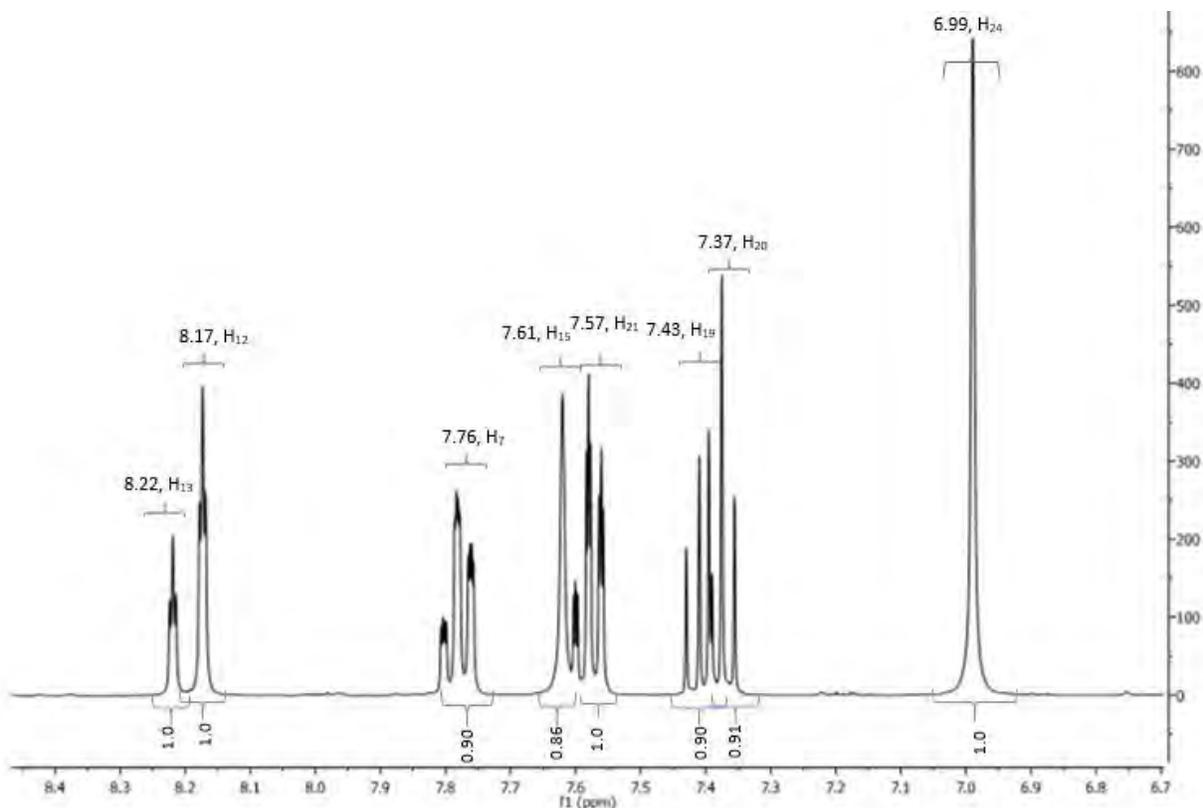


Figura 22. Ampliación de la región aromática del espectro de RMN- ^1H del compuesto **NICQ3**

De acuerdo con las señales obtenidas en los espectros analizados para la caracterización del compuesto **NICQ3**, el producto derivado de quinazolina si fue obtenido, sin embargo, con los estudios de caracterización realizados no son suficientes para asegurar que la amida entre la 2,4-diamino-6-nitroquinazolina y el ácido 3-acetaminobenzoico fue formada en posición 4 del núcleo de quinazolina, para ello, sería necesario realizar una resonancia magnética bidimensional NOESY. En esta tesis se propone que la estructura del compuesto obtenido es la que se presenta en la tabla 7 debido a resultados de otros compuestos sintetizados por el grupo de investigación.⁵⁵

7.2.4. Síntesis y caracterización de 3-acetilamino-*N*-(4-amino-6-nitroquinazolin-2-il)benzamida (**NICQ4**)

Con la finalidad de incrementar la solubilidad de la 2,4-diamino-6-nitroquinazolina (2) en el disolvente empleado para la reacción de formación de la amida, este compuesto fue disuelto previamente en DMF (dimetilformamida) ya que es más soluble en que en acetonitrilo. Luego, al igual que para el compuesto **NICQ3**, la primera reacción que se realizó fue la de activación del ácido 3-acetilaminobenzoico (1) con CDI (1-1'-

carbonildiimidazol) en condiciones anhidras empleando acetonitrilo como disolvente y luego, en el mismo matraz, se realizó la reacción de formación de la amida. Es importante mencionar que trabajos previos han mostrado que el uso de DMF como disolvente e incluso un aumento de temperatura favorecen la formación de la amida en posición 2 del núcleo de quinazolina.⁵⁵ En este caso la reacción se realizó a temperatura ambiente, agitación constante y bajo atmósfera de nitrógeno. Al terminar, se recristalizó con acetonitrilo la 2,4-diamino-6-nitroquinazolina sin reaccionar y se concentró a presión reducida para dar lugar a un líquido de aspecto resinoso, el compuesto final se intentó recristalizar con acetonitrilo, cloroformo, diclorometano y por par de disolventes con $\text{CHCl}_3:\text{CH}_2\text{Cl}_2$ sin éxito, de forma que del líquido se registraron los espectros de infrarrojo y resonancia magnética nuclear de protón pues ya contenían al compuesto puro.

En el espectro infrarrojo, se observa una banda ancha en 3122.25 cm^{-1} propia del estiramiento del enlace N-H del grupo amida, también es posible observar dos bandas pequeñas características de las vibraciones de estiramiento de C=C del anillo aromático. Una banda en 1551.81 cm^{-1} corresponde al estiramiento C=O del grupo amida, en 1667.58 cm^{-1} hay una banda correspondiente al estiramiento C=N. De igual forma, es posible notar una banda en 1371.90 cm^{-1} propia del grupo nitro unido a un anillo aromático.

El espectro de RMN-¹H muestra en 2.0 ppm un singulete que integra para tres protones, el cual corresponde a H₂₇, en 7.02 ppm se observa un singulete que integra para un protón correspondiente a H₂₄, en 7.38 ppm se muestra un triplete con acoplamiento de 7.9 Hz en orto que integra para el protón H₂₁, en 7.60 ppm hay otra señal que corresponde a un doble de dobles con acoplamiento de 6.5 Hz en orto y 1.2 Hz en meta e integra para el protón H₁₉, además en 7.65 ppm hay otro singulete que integra para un protón correspondiente a H₇, otra señal en 7.78 ppm es un doblete con acoplamiento en meta de 1.1 Hz que integra para el protón H₁₂, para terminar con la región aromática, en 8.19 ppm hay un singulete que integra para el protón H₁₃, finalmente en 10.10 ppm hay un singulete que integra para un protón y corresponde a H₁₅.

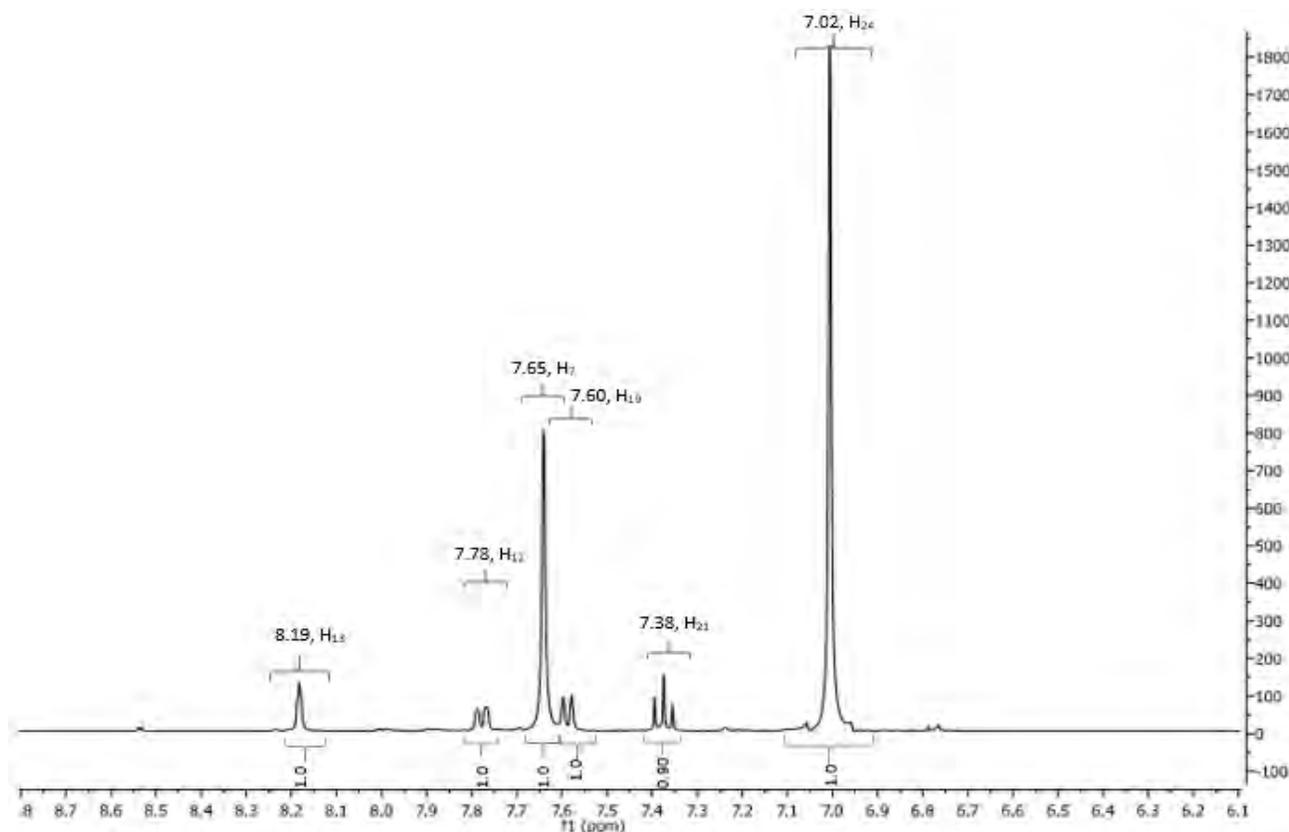


Figura 23. Ampliación de la región aromática del espectro de RMN-¹H del compuesto **NICQ4**

Las señales que se presentan en ambos espectros del compuesto **NICQ4** permiten comprobar la presencia del compuesto derivado de quinazolina en el líquido de aspecto resinoso, sin embargo, al igual que en el caso del compuesto **NICQ3** no es posible comprobar únicamente con RMN-¹H que la estructura propuesta en la tabla 7 fue la obtenida, para ello sería necesario una resonancia magnética nuclear bidimensional NOESY.

Es importante mencionar que no fue posible enviar este producto a evaluación biológica debido a que no se disponía de cantidad suficiente por el bajo rendimiento después de purificar. Además, a pesar de los esfuerzos realizados por reproducir la síntesis no se pudo volver a obtener el producto.

7.2.5. Síntesis y caracterización de *N*-(2-amino-6-nitroquinazolin-4-il)-3-metoxibenzamida (NICQ5)

Para obtener el compuesto **NICQ5** se realizó una reacción de adición-eliminación entre el cloruro de 3-metoxibenzoilo (F) y la 2,4-diamino-6-nitroquinazolina (2) para formar una amida. En este caso, tampoco fue necesario emplear un agente activante ya que el cloruro, como ya se mencionó, es un buen grupo saliente. La adición del cloruro se llevó a cabo en un baño de hielo y en presencia de una base con la finalidad de neutralizar el cloruro de hidrógeno resultante. El monitoreo de la reacción se realizó con cromatografía en capa fina (ccf) y una vez que finalizó, la mezcla se filtró al vacío para eliminar el compuesto **2** sin disolver ni reaccionar y posteriormente se concentró el disolvente a presión reducida para obtener así un líquido de aspecto aceitoso. Como únicamente había otro compuesto (2,4-diamino-6-nitroquinazolina que no se eliminó filtrando) además del deseado se intentó purificar el compuesto final por recristalización por par de disolventes EtOH:Hexano, sin embargo no fue posible de forma que se realizó una percolación con gel de sílice en un embudo de vidrio poroso. Esto con la finalidad de que el compuesto más polar se quedara retenido en la sílice y el menos polar se disolviera en cloroformo. Para realizarla fue necesario disolver la mezcla aceitosa con ambos compuestos en cloroformo, pasarla a través de la sílice y limpiar con cloroformo, y luego pasar a través de la sílice metanol limpio para así obtener el compuesto retenido. Posteriormente se concentró la fase del cloroformo a presión reducida para así dar lugar a un sólido color amarillo del que se registraron los espectros de infrarrojo y resonancia magnética nuclear de protón.

En el espectro infrarrojo es posible observar una banda en 3073.63 cm^{-1} característica del estiramiento N-H de la amida, a su vez se observa una banda en 3008.78 cm^{-1} propia del estiramiento simétrico y asimétrico del enlace N-H de amina primaria, también es posible notar una banda intensa en 1685.49 cm^{-1} del estiramiento C=O del carbonilo de la amida, de igual forma se observan bandas estrechas en 1581.87 , 1603.35 , 1487.53 y 1464.43 cm^{-1} de las vibraciones de estiramiento de C=C aromáticos.

El espectro de RMN- ^1H muestra en la región alifática una señal en 3.70 ppm que corresponde a un singulete que integra para tres protones de H₂₅.

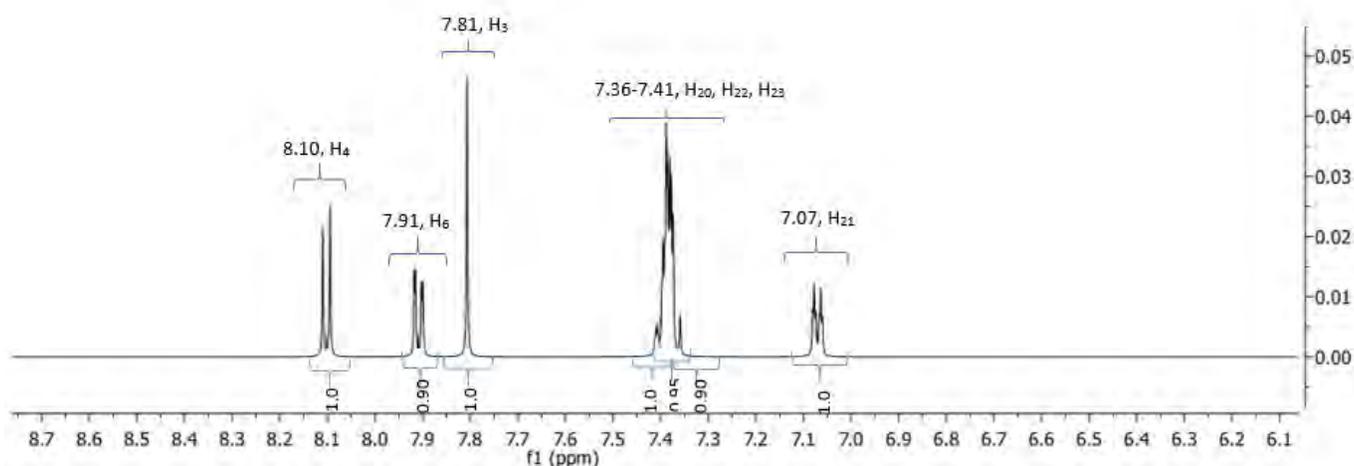


Figura 24. Ampliación de la región aromática del espectro de RMN- ^1H del compuesto **NICQ5**

Por otra parte, en la región aromática, es posible notar una señal en 7.07 ppm que integra para un protón correspondiente a H_{21} , un singulete en 7.36 ppm que integra para el protón H_{20} , un doblete en 7.39 ppm con acoplamiento en orto de 7.1 Hz que integra para el protón H_{23} , un doble de dobles en 7.41 ppm con acoplamientos en meta de 3.7 y 2.2 Hz que corresponde al protón H_{21} , otra señal se presenta en 7.81 ppm como un singulete que integra para un protón (H_3), finalmente se presentan en 7.91 y 8.10 dos dobletes que acoplan con 2.1 Hz- meta y 7.40 Hz-orto respectivamente y corresponden a los protones H_6 y H_4 .

De los resultados obtenidos es posible afirmar que se obtuvo un derivado de quinazolina, sin embargo, para asegurar que la estructura propuesta para **NICQ5** es la que se encuentra en la tabla 7, sería necesario realizar una resonancia magnética nuclear bidimensional NOESY.

La estructura propuesta fue la indicada en la tabla 7 debido a la experiencia con otros derivados de quinazolina semejantes que fueron sintetizados en el grupo de investigación, en los que la sustitución ocurrió en posición 4 que a pesar de que los dos grupos amino en posición 2 y 4 del núcleo de quinazolina estaban libres.⁵⁵

7.3. Evaluación de la actividad biológica

En otros términos, la citotoxicidad celular se define como una alteración de las funciones celulares básicas que conlleva a un daño que puede ser detectado y que en la mayoría de los casos causa la muerte celular.⁵⁵ A lo largo de los años se han desarrollado una gran

cantidad de métodos y pruebas *in vitro* para predecir los efectos tóxicos que tendrán algunos fármacos y compuestos químicos, usando como modelos experimentales cultivos primarios, órganos aislados y líneas celulares establecidas. Dentro de los ensayos más conocidos, validados y optimizados, se encuentran: el ensayo de captación de rojo neutro, el ensayo de reducción de bromuro de 3-(3,5-dimetil-2-triazolil)-2,5-difeniltetrazolico (MTT) y el ensayo con sulforrodamina B (SRB).⁵⁶

Se esperaba que los derivados de quinazolina sintetizados en el presente trabajo presentaran actividad citotóxica en líneas celulares de cáncer con cierta selectividad hacia las líneas de cáncer de mama (MCF-7 y MDA-MB-231) y menor o nula citotoxicidad en la línea celular primaria (FGH). Para su evaluación, se empleó el ensayo con sulforrodamina B (SRB).

El ensayo con SRB, es usado para determinar la densidad celular basándose en la medición del contenido de proteína celular.⁵⁷ El ensayo está basado en la habilidad del colorante sulforrodamina B de interaccionar electrostáticamente y de forma dependiente del pH con residuos de aminoácidos proteicos de naturaleza básica; en condiciones ácidas, la SRB se une a residuos de aminoácidos básicos de las células previamente tratadas con ácido tricloroacético. Posteriormente, la SRB es extraída cuantitativamente y solubilizada para la medición de su densidad óptica (OD) empleando una base débil como TRIS (tris(hidroximetil)aminometano). La sensibilidad del método es equiparable a otros métodos de fluorescencia y superior al método de Lowry o Bradford para cuantificación de proteínas, otra ventaja es que es un método rápido y no costoso.⁵⁸

La sulforrodamina B (SRB) es un colorante de aminoxantano que posee dos grupos sulfónicos $-SO_3^-$ cargados negativamente, capaces de unirse electrostáticamente a cationes, de forma que, como ya se mencionó, en condiciones ácidas (en ácido acético al 1%) la SRB aumenta su afinidad por aminoácidos básicos de las proteínas y permite su cuantificación al eliminar la SRB que no se unió motivo por el cual las células deben ser previamente fijadas con ácido tricloroacético (TCA) y extraer únicamente el colorante que si se unió a las proteínas con un medio alcalino (TRIS pH 10.5). Las lecturas se realizan a una absorbancia de 564 nm.⁵⁸

La determinación de la presencia de actividad biológica (en este caso actividad antitumoral o citotóxica) de los compuestos se realizó evaluando la sensibilidad de líneas celulares malignas ante una sola concentración de cada compuesto (50 μ M). Las líneas celulares

evaluadas fueron: PC-3 (línea celular de cáncer de próstata), HCT-15 (cáncer de colon), MCF-7 (cáncer de mama), MDA-MB-231 (cáncer de mama) y FGH (línea celular primaria de fibroblastos).

La línea MCF-7 es útil para estudios de cáncer de mama *in vitro* porque posee características particulares del tejido epitelial de las mamas. Entre estas características, se incluye la capacidad de las células de procesar estradiol por medio de receptores estrogénicos (ER), lo que hace que sea una línea celular ER⁺ control. Por otro lado, la línea MDA-MB-231 es una ampliamente usada para estudios *in vitro* de cáncer de mama independiente de hormonas, debido a que las células no expresan receptores estrogénicos; además las células tampoco expresan la proteína HER-2 por lo que es considerada una línea de cáncer de mama triple negativo. El uso de ambas líneas en el estudio para la determinación de la actividad antitumoral de los compuestos sintetizados era de suma importancia pues permitiría comprobar o rechazar la hipótesis de que los compuestos, al acoplarse y formar interacciones teóricas con receptor estrogénico alfa humano, tendrían como blanco este receptor y por tanto presentarían cierta selectividad sobre la línea MCF-7 por ser una línea ER⁺.

A continuación, se presenta una tabla con los resultados de la evaluación de los compuestos sintetizados sobre las 4 líneas de cáncer y una línea de células sanas (línea primaria/ FGH). Debido a que el compuesto **NICQ1** no fue el esperado y que no se obtuvo la cantidad requerida para el estudio del compuesto **NICQ4**, únicamente se evaluaron los compuestos **NICQ2**, **NICQ3** y **NICQ5**.

Tabla 8. Porcentaje de inhibición de crecimiento de las cinco líneas celulares evaluadas en presencia de los compuestos **NICQ2**, **NICQ3** y **NICQ5** a 50 μ M.

Compuesto	% Inhibición del crecimiento				
	PC-3	HCT-15	MCF-7	MDA-MB-231	FGH
2	35.6 \pm 4.0	21.7 \pm 3.1	22.7 \pm 6.9	22.7 \pm 3.2	NC
3	28.7 \pm 1.2	17.8 \pm 9.4	17.3 \pm 2.7	28.8 \pm 7.2	NC
5	25.2 \pm 1.1	26.1 \pm 5.1	27.4 \pm 11.1	28.3 \pm 5.3	NC
Tamoxifen	58.99 \pm 7.1	53.58 \pm 0.3	26.61 \pm 2.9	Nd	9.87 \pm 0.4

NC: No citotóxico Nd: No determinado

PC3: células cancerosas de prostata; HCT-15: células cancerosas de colon; MCF-7: células cancerosas de glándulas mamarias receptor positivo; MDA-MB-231: células cancerosas de glándulas mamarias triple negativa; FGH: células primarias de fibroblastos.

De acuerdo con los resultados obtenidos que se presentan en la tabla 8 es posible decir que los tres compuestos evaluados presentaron actividad antitumoral pues mostraron inhibición en el crecimiento de las células de todas las líneas de cáncer que fueron probadas, esto no resultó como se esperaba, pues de acuerdo con la hipótesis planteada al inicio de esta tesis, se esperaba que los compuestos tuvieran cierta selectividad sobre la línea MCF-7 por ser ER⁺, poca inhibición del crecimiento en el resto de las líneas incluyendo MDA-MB-231 por ser una línea de cáncer de mama triple negativo. En un inicio, se pensaba que estos compuestos tendrían actividad sobre el receptor estrogénico, es decir, sería su blanco molecular, por resultados previos obtenidos en el grupo de investigación que mostraron que compuestos derivados de quinazolina estructuralmente similares presentaron una mayor inhibición del crecimiento sobre la línea MCF-7 que sobre las demás, lo cual permitió pensar que el receptor estrogénico podría ser un receptor clave en la actividad y en la selectividad.

Al realizar los estudios de acoplamiento molecular de los compuestos **NICQ1-NICQ5** con el receptor estrogénico alfa humano (ER- α) se encontró que todos se acoplaron casi en el mismo sitio y presentaron interacciones de tipo puente de hidrógeno con los residuos de aminoácidos del receptor, al igual que un derivado de quinazolina sustituido en posición 6 con una benzamida con actividad registrada y una ligera selectividad a células MCF-7 esto, permitió suponer que todos presentarían actividad y en mayor parte los compuestos **NICQ1** y **NICQ3** por tener la mayor cantidad de interacciones y la menor energía de unión (junto con **NICQ5**). Efectivamente todos los compuestos que si fueron evaluados presentaron actividad, pero no únicamente ni de forma preponderante sobre MCF-7 sino que en todas las líneas. Los tres compuestos presentaron una inhibición del crecimiento que fue similar en las cuatro líneas de cáncer, se propone que esto ocurrió debido a que el blanco de los compuestos derivados de quinazolina no es únicamente el receptor estrogénico, sino también algún otro que se expresa de forma mayoritaria en células con distintos tipos de cáncer pero no en células sanas, además no hay que olvidar que los estudios de acoplamiento están basados en cálculos teóricos.

En relación a la desviación estándar de los resultados de actividad en términos de % de inhibición de crecimiento está resultó ser amplia para casi todas las evaluaciones debido a que en las réplicas realizadas para la evaluación de cada compuesto en cada línea celular los compuestos tuvieron un comportamiento errático, pues en algunas ocasiones inhibían

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

más el crecimiento que en otras, se propone que esto ocurrió posiblemente por la inestabilidad de las moléculas en los medios de cultivo suplementados con suero fetal bovino que poseen proteasas.

Algo que es importante resaltar es que ninguno de los compuestos evaluados presentó inhibición del crecimiento (actividad citotóxica) sobre la línea celular primaria de células sanas (FGH), este resultado es de gran importancia, como ya se mencionó previamente, una de las desventajas que presenta la terapéutica del cáncer de mama y de todos los tipos de cáncer, es la gran cantidad de efectos adversos que en general, resultan de que también se afectan a células sanas durante el tratamiento. El que un compuesto no presente actividad citotóxica en células sanas *in vitro*, pero si en células de cáncer puede llevar a pesar que *in vivo* tampoco presentará actividad y por tanto la cantidad de efectos adversos será mucho menor o nula.

Los compuestos que fueron sintetizados y evaluados son *hits* que podrían convertirse en prototipos al optimizarlos para incrementar su potencia y que por tanto tengan un mayor porcentaje de inhibición de crecimiento.

8. CONCLUSIONES

Se sintetizaron 4 derivados de quinazolina por diferentes rutas de síntesis. También se logró la obtención de un intermediario de activación de un ácido con potencial para lograr formar un derivado de quinazolina por un método distinto al planteado en esta tesis. Es posible lograr la formación de una amida en posición 6 del núcleo quinazolin-2,4,6-triamina a pesar de que los grupos amino en posición 2 y 4 estén libres, lo cual indica que el poder nucleofílico del nitrógeno del grupo amina en posición 6 es mayor, de igual forma es posible llevar a cabo la formación de una amida en 2 ó 4 (si en 6 se mantiene el nitro).

Los compuestos obtenidos se caracterizaron por medio de dos técnicas espectroscópicas: espectroscopía infrarrojo y resonancia magnética nuclear de protón y, aunque con estas técnicas fue posible saber si la formación de un derivado de quinazolina se llevó a cabo o no, se sugiere realizar otros estudios como lo son: espectrometría de masas (EM), resonancia magnética nuclear de carbono (RMN-C¹³) y análisis bidimensional (NOESY).

Se realizó el estudio de acoplamiento molecular (*docking*) de los compuestos **NICQ1-NICQ5** con el receptor estrogénico alfa humano (ER- α), con el que inicialmente se planteaba que era el blanco molecular de los compuestos debido a resultados obtenidos en otras investigaciones realizadas en el grupo de investigación. Todos los compuestos acoplaron con el dominio de unión a ligando del receptor y presentaron interacciones de tipo puente de hidrógeno con los residuos de aminoácidos, los que presentaron el mayor número de interacciones y menor energía de unión fueron **NICQ1, NICQ3 y NICQ5**.

La actividad citotóxica de tres de los compuestos sintetizados fue evaluada sobre 4 líneas celulares de cáncer y una línea primaria de fibroblastos (células sanas). Entre las líneas de cáncer se encontraban dos de cáncer de mama, una ER⁺ (MCF-7) y otra triple negativa (MDA-MB-231) ya que la hipótesis inicial era que los derivados de quinazolina sintetizados en esta tesis serían selectivos sobre la línea MCF-7 al tener como blanco molecular al receptor estrogénico. Sin embargo, esto no resultó así, ya que los tres compuestos presentaron valores de inhibición del crecimiento de todas las líneas celulares de cáncer bastante parecidos y no es posible notar tendencia de selectividad.

Aunque los porcentajes de inhibición del crecimiento de los tres compuestos evaluados son bajos, todos fueron específicos para líneas de cáncer al no presentar inhibición de crecimiento en el caso de la línea primaria FGH de células sanas.

A pesar de que la hipótesis de que los compuestos sintetizados tendrían selectividad sobre la línea MCF-7 se rechaza, los resultados obtenidos fueron de suma importancia ya que los compuestos evaluados **NICQ2, NICQ3 y NICQ5** son compuestos *hit* que no fueron citotóxicos para la línea celular primaria, lo cual hace que seguir estudiándolos y optimizándolos para incrementar su actividad sea de principal interés puesto que un problema en la quimioterapia del cáncer es la gran cantidad de efectos adversos que presentan debido a que los actuales agentes actúan también sobre células sanas.

9. PERSPECTIVAS

Dados los resultados de esta tesis, se propone como perspectiva seguir con el paso conocido en química farmacéutica como *hit to lead* para así obtener un compuesto prototipo o cabeza de serie. Para ello sería necesario optimizar cualquiera de los tres compuestos para incrementar su actividad por supuesto intentando que la actividad únicamente se presente en líneas de cáncer. Se propone que el compuesto **NICQ5** sería una buena opción debido a que su síntesis es la más sencilla, no requiere de la formación de intermediarios de reacción y fue el producto más activo. Algunas estrategias para la optimización pueden ser incrementando la liposolubilidad del compuesto o añadiendo sustituyentes en el anillo de la benzamida en posición 2 y 4.

10. REFERENCIAS

1. Torre, L.; Siegel, R.; Jemal, A. Global Cancer Facts and Figures, 3 ed. American Cancer Society. **2015**.1-8.
2. Alanazi, A.; *etal.* Design, Synthesis and Biological evaluation of Some Novel Substituted quinazolines as Antitumor Agents. *Eur.J.Med.Chem.* **2014**. 79. 446-454.
3. Cancer Research UK. About Cancer. <http://cancerresearchuk.org/aboutcancer/> (Acceso: Dic 26, 2016).
4. American Cancer Society. Learn About Cancer. <http://cancer.org/> (Acceso: Dic 26, 2016).
5. Instituto Nacional del Cáncer. Institutos Nacionales de Salud en EE.UU. <http://cancer.gov/espanol/instituto>(Acceso: Dic 26, 2016).
6. Weston, A; Harris, C. Multistage Carcinogénesis. *Cancer Medicine*, 6ed. BC Decker, 2003.
7. Siddiqui, I.; *etal.* Resveratrol Nanoformulation for Cancer Prevention and Therapy. *Annals of the New York Academy of Sciences.***2015**. 40. 1-12.
8. Kumar, S.; Weaver, V. Mechanics, Malignancy and Metastasis: The Force Journey of a Tumor Cell. *Cancer Metastasis Rev.* **2009**. 28. 113-127.
9. Raymond, W.; Ruddon, M. What Makes a Cancer Cell a Cancer Cell? *Cancer Medicine*, 6ed. BC Decker, 2003.
10. Wu, S; *etal.* Substantial Controbution of Extrinsic Risk Factors to Cancer Development. *Nature Article Research.* **2016**. 529. 43-47.
11. Doll, R; Petto, R. The Causes of Cancer: Quantitative Estimates of Avoidable Risks of Cancer in the United States Today. *J. Natl Cancer Inst.* **1981**. 66. 1191-1308.
12. Kolonel, L; Altshuler, D; Henderson, B. The Multiethnic Cohort Study; Exploring Genes, Lifestyle and Cancer Risk. *Nature Rev Cancer.* **2004**. 4. 519- 527.
13. Tankala, T.; *etal.* Chemical-Induced carcinogenesis. *J. Exp. Clin. Med.* **2013**. 5. 203-209.
14. Hanahan, D.; Weinberg, R. The hallmarks of cancer. *Cell.* **2000**. 100. 57-70

15. Colotta, F.; *etal.* Cancer-related Inflammation, The Seventh Hallmark of Cancer: Links to Genetics Instability. **2009**. 30. 1073-1081.
16. Luch, A. Nature and Nurture- Lessons from Chemical Carcinogenesis. *Nature Rev Cancer*. **2005**. 5. 113-124.
17. Lodish, H.; *etal.* Proto-Oncogenes and Tumor Suppressor. En *Molecular Cell Biology*. 4ed. W.H. Freeman Nueva York.2000.
18. Lodish, H.; *etal.* DNA Damage and Repair and Their Role in Carcinogenesis. *Molecular Cell Biology*. 4ed. W.H. Freeman Nueva York.2000.
19. Khanna, K.; Jackson, S. DNA-Double-Strand Breaks: Signaling, Repair and the Cancer Connection. *Nature Genetics*. **2001**. 27. 247-254.
20. Serghianis, T. *etal.* Risk Factors for Multiple Myeloma: A Systematic Review of Meta-Analyses. *Clinical Lymphoma, Myeloma and Leukemia*. 2015. 15. 563-576.
21. Leiber, M. y Efferth, T. Molecular Principles of Cancer Invasion and Metastasis. *Int J Oncol*. **2009**. 34. 881-895.
22. Steeg, P. Targeting Metastasis. *Nature Rev Cancer*. **2016**. 16. 201-218.
23. Yokota, J. Tumor Progression and Metastasis. *Carcinogenesis*. **2000**. 21. 497-503.
24. Husemann, Y. *etal.* Systemic Spread Is An Early Step In Breast Cancer. *Cancer Cell*. **2008**. 13. 58-68.
25. Hutchinson, L. Breast Cancer: Challenges, Controversies, Breakthroughs. *Nature Rev Clin Oncol*. **2010**. 7. 669-670.
26. DeSantis, C.; Siegel, R.; Jemal, A. Breast Cancer: Facts and Figures 2015-2016. American Cancer Society. **2015**. 1-2.
27. Tomao, F. *etal.* Triple-negative Breast Cancer: New Perspectives for targeted therapies. *Onco Targets Ther*. **2015**. 8. 177-193.
28. Marusyk, A.; Polyak, K. Tumor Heterogeneity: Causes and Consequences. *Biochim Biophys Acta*. **2010**. 1805. 105.
29. Tang, W. *etal.* Classification, Treatment Strategy, and Associated Drug Resistance in Breast Cancer. *Clinical Breast Cancer*. **2016**. 16. 335-343.

30. Nacional Breast Cancer Foundation, Inc. About Breast Cancer. <http://nationalbreastcancer.org/what-is-breast-cancer> (Acceso: Enero, 23,2017).
31. Ferlay, J.etal. Cancer Incidence and Mortality Worldwide: Sources, Methods and Major Patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*. **2015**. 136-386.
32. Torre, L. *etal*. Global Cancer Statistics 2012. *CA Cancer J Clin*. **2015**. 108. 65-87.
33. Instituto Nacional de Estadística y Geografía INEGI. Estadísticas a propósito del día mundial contra el cáncer. http://www.inegi.org.mx/saladeprensa/aproposito/2016/cancer2016_0.pdf (Acceso: 26, Ene 2017).
34. Organización Mundial de la Salud OMS. Cáncer. Nota descriptiva no. 297. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/> (Acceso: 26, Ene 2017).
35. Instituto Nacional de Estadística y Geografía INEGI. Estadísticas a propósito del día mundial de la lucha contra cáncer de mama. http://www.inegi.org.mx/saladeprensa/aproposito/2016/mama2016_0.pdf (Acceso: 31, Ene 2017).
36. Adamowicz, K. *etal*. Combinig Systemic Therapies with Radiation in Breast Cancer. *Cancer Treatment Reviews*. **2009**. 35. 409-416.
37. Secretaría de Salud México. Estadísticas de cáncer de mama y cáncer cervico-uterino. [http:// www.gob.mx/salud/acciones-y-programas/informacion-estadistica](http://www.gob.mx/salud/acciones-y-programas/informacion-estadistica) (Acceso: 31, Ene 2017)
38. Instituto Nacional de Cancerología (INCAN). Info cáncer: Acerca del cáncer. <http://www.infocancer.org.mx> (Acceso: 31, Ene 2017)
39. Rajamanickam, B. *etal*. Cancer and Radiation Therapy: Current Advances and Future Directions. *Int J Med. Sci*. **2012**. 9. 193-199.
40. Brentzen, S. Preventing or Reducing Late Side Effects of Radiation Therapy: Radiobiology Meets Molecular Pathology. *Nat Rev Cancer*. **2006**. 6. 702-713.
41. Nussbaumer, S. *etal*. Analysis of Anticancer Drugs: A Review. *Talanta*. **2011**. 85. 2265-2289.
42. Caley, A., Jones, R. The Principles of Cancer Treatment by Chemotherapy. *Surgery*. **2012**. 30. 186-190.

43. Sonnenblick, A. *et al.* Is the Differentiation into Molecular Subtypes of Breast Cancer Important for Staging, ¿Local and Systemic Therapy, and Follow Up? *Cancer Treatment Reviews*. **2014**. 40. 1089-1095.
44. De la Garza, J. Sánchez, P. *El cáncer*. 1ed. Universidad Autónoma de Nuevo León. 2014.
45. Anampa, J., Makower, D, Sparano, J. Progress in Adjuvant Chemotherapy for Breast Cancer: An Overview. *BMC Medicine*. **2015**. 13. 1-13.
46. May, F. Novel Drugs that Target The Estrogen-Related Receptor Alpha: Their Therapeutic Potential in Breast Cancer. *Cancer Management and Research*. **2014**. 6. 225-252.
47. Wen Ng, H *et al.* Competitive Molecular Docking Approach for Predicting Estrogen Receptor Subtype α Agonist and Antagonist. *BMC Bioinformatics*. **2014**.15. 1-15.
48. Renoir, M., Marsaud, V., Lazennec, G. Estrogen Receptor Signaling as a Target for Novel Breast Cancer Therapeutics. *Biochemical Pharmacology*. **2013**. 85. 449-465.
49. Johntson, S. New Strategies in Estrogen Receptor- Positive Breast Cancer. *Clin Cancer Res*. **2010**. 16. 1979-1987.
50. El-Azab, A. *et al.* Desing, Synthesis and Biological Evaluation of Novel Quinazoline Derivatives as Potential Antitumor Agents: Molecular Docking Study. *Eur. J. Med. Chem*. **2010**. 45. 4188-4198.
51. Malleshappa, N. *et al.* Synthesis and In vitro Antitumor Activity of Substituted Quinazoline and Quinoxaline Derivatives: Search for Anticancer Agent. *Eur. J. Med. Chem*. **2011**. 46.2327-2346.
52. Ferreira, F. *et al.* Molecular Docking and Structure-Based Drug Design Strategies. *Molecules*. **2015**. 20. 13384-13421.
53. Seeliger, D., De Groot, B. Ligand Docking and Binding Site Analysis with PyMol and Autodock/Vina. *J Comput Aided Mol Des*. **2010**. 24. 417-422.
54. Mayo, D. *et al.* *Microscale Techniques for the Organic Laboratory*. John Wiley and Sons. 1991.

55. Garduño, R. Estudio de Moléculas Híbridas entre Derivados de Quinazolina y Antiinflamatorios No Esteroideos como Agentes Citotóxicos. Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad de México. 2017.
56. Arrebola, D. *etal.* Principales Ensayos para Determinar la Citotoxicidad de una Sustancia, Algunas Consideraciones y su Utilidad. *Toxicología en línea*. **2003**. 41-52.
57. Vichai, V., Kirtikara, K. Sulforhodamine Colorimetric Assay for Cytotoxicity Screening. *Nature Protocols*. **2006**. 1. 1112-1116.
58. Voigt, W. Sulforhodamine B Assay and Chemosensitivity. *Chemosensitivity*. Rosalyn D. Blumenthal. 1.2005
59. George, J. *An Introduction to Hydrogen Bonding*. Oxford University Press. 1997.
60. Hughes, JP. *etal.* Principles of Early Drug Discovery. *Br J Pharmacol*. **2011**.162. 1239-1249.
61. Hu, Y., Stumpfe, D., Bajorath, J. Computational Exploration of Molecular Scaffolds in Medicinal Chemistry.

APÉNDICE I. PARTE EXPERIMENTAL

En este apartado se detalla el procedimiento experimental desarrollado para la síntesis y purificación de los compuestos 1–3 y **NICQ1-NICQ5**.

Reactivos y equipos empleados para la síntesis y purificación de los compuestos

La materia prima y los reactivos empleados para la síntesis de todos los compuestos presentados fueron compradas a la compañía Sigma-Aldrich.

Las materias primas, reactivos y compuestos sólidos se pesaron en una balanza analítica marca Adventurer OHAUS, mientras que las materias primas y reactivos líquidos se midieron con una micropipeta Transferpette marca Brand de 20-200 μL con puntas amarillas.

Para la síntesis del ácido 3-acetamidobenzoico (1) se empleó una parrilla automática marca IKA modelo RCT basic con sensor de temperatura marca IKA modelo ETS-D4 fuzzy, para el resto de las reacciones se emplearon una parrilla automática marca IKA RCT basic y un agitador magnético marca IKA modelo Topolino S1.

La hidrogenación catalítica se realizó en un equipo para hidrogenación marca PARR modelo 3916 EG adaptado a un tanque de hidrógeno de la casa INFRA.

Para evaporar los disolventes (concentrar) de las mezclas de reacción se empleó un rotaevaporador IKA RV 10 digital conectado a una bomba de vacío marca Vacuubrand modelo PC 3001 vario pro.

Todos los disolventes empleados tanto para la síntesis como para la purificación fueron grado analítico, adquiridos de distintos proveedores y usados sin previa purificación.

Cromatografías

Para monitorear las reacciones y verificar la pureza de los intermediarios y productos finales se empleó la técnica de cromatografía en capa fina (ccf), para ello se emplearon placas de aluminio con gel de sílice marca Merck tipo TLC silica gel 60 F₂₅₄, para revelarlas una vez eluidas se empleó una lámpara de luz UV marca Spectroline ENF-240C de onda corta y onda larga.

Los sistemas de elución con su respectiva composición que se emplearon fueron:

Sistema I Hex/AcOEt (5:5)

Sistema II $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (8:2)

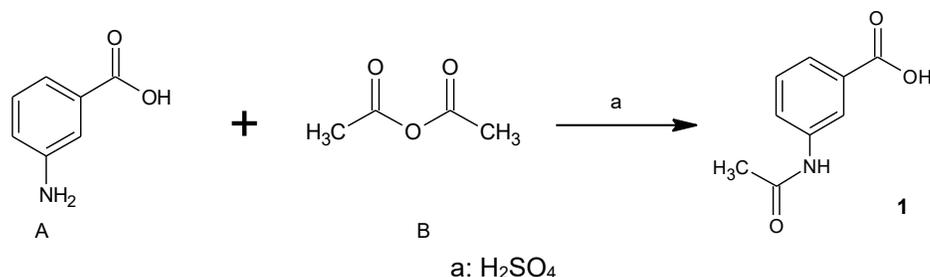
Sistema III $\text{CHCl}_3/2\text{-propanol}$ (7:3)

Para la purificación del compuesto **NICQ1** se empleó una cromatografía preparativa en la que se emplearon placas de vidrio con gel de sílice marca Merck tipo PLC silica gel 60 F₂₅₄ de 1 mm.

Caracterización y pureza de compuestos

Además de verificar la pureza de los intermediarios y compuestos mediante cromatografía en capa fina (ccf), se determinó el punto de fusión de los compuestos **NICQ1-NICQ5** con un aparato electrothermal modelo M8144 usando capilares cerrados.

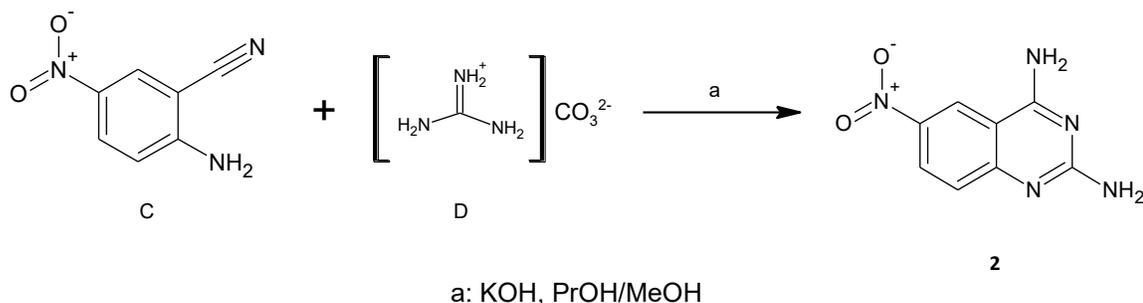
Síntesis de Ácido 3-acetilaminobenzoico (1)



En un matraz bola de 250 mL se colocaron 0.4960 g (3.62 mmol) de ácido 3-aminobenzoico (A), 20 mL de anhídrido acético (B) y 1 gota de ácido sulfúrico concentrado. Posteriormente, se adaptó un refrigerante, una trampa anhidra y se dejó en agitación constante a 70°C con un baño de aceite y parilla magnética durante 2 h. Pasado este tiempo, se apagó el calentamiento y se dejó enfriar. Enseguida, se añadieron 20 mL de agua destilada y se midió el pH de la mezcla con tiras reactivas para comprobar la acidez de la misma. Para la obtención del producto sólido, se realizó una extracción acetato de etilo: agua, por lo que, en un embudo de separación se colocó la mezcla junto con 20 mL de agua y 20 mL de acetato de etilo. Este proceso se repitió por triplicado y en todos los casos se recolectó la fase orgánica, la cual, se concentró a presión reducida a 40°C con un rota-evaporador para dar lugar a un sólido color blanco que se raspó de las paredes del matraz y se lavó con 2 mL de metanol frío. Se obtuvieron 0.3451 g de compuesto 1 lo cual equivale a un rendimiento del 53.2%.

Rf: 0.20 Sistema: II Pf: 244.3-245.7°C

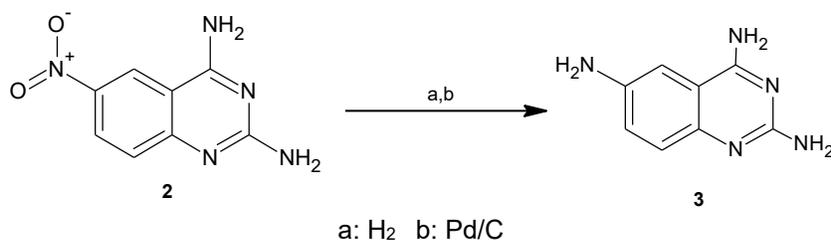
Síntesis de 2,4-diamino-6-nitroquinazolina (2)



En un matraz bola de 250 mL se colocaron 1.4913 g (9.14 mmol) de 2-amino-5-nitrobenzotrile (C), y 1.2334 g (10.27 mmol) de carbonato de guanidina (D). Aparte, en un vaso de precipitados de 50 mL, se colocaron 0.615 g (10.98 mmol) de KOH y en una probeta de midieron 25 mL de una mezcla de propanol-etanol (15 mL de propanol y 5 mL de etanol). La mitad de la mezcla de disolventes se agregó al matraz, seguido del KOH, luego, se inició la agitación y se añadió el resto de la mezcla de disolventes. Finalmente, el matraz se adaptó a un refrigerante para reflujo y a una trampa anhidra y se dejó en agitación con calentamiento a 90°C en un baño de aceite con parilla magnética durante 4 h. Pasado este tiempo se observó la presencia de un precipitado naranja el cual se filtró al vacío en caliente. A continuación, se agregó agua hasta que el pH del filtrado fue de 7 y se lavó con metanol varias veces hasta que el filtrado fue incoloro. Se obtuvieron 1.342 g de compuesto **2** lo cual equivale a un rendimiento del 71.6%.

Rf: 0.46 Sistema: III Pf: 364.1-366.3 °C con descomposición.

Síntesis de quinazolin-2,4,6-triamina (3)

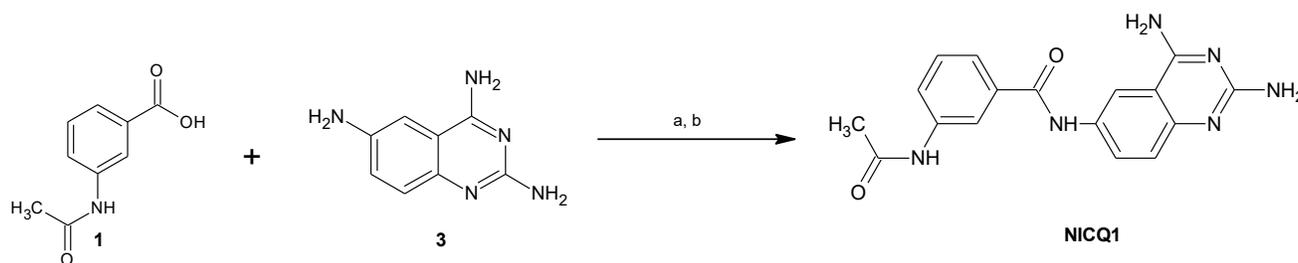


Se pesaron 0.294 g (0.77 mmol) de 2,4-diamino-6-nitroquinazolina (2) y se colocaron en un vaso Paar para hidrogenación previamente enjuagado con metanol. Posteriormente se agregaron 0.02870 g de catalizador Pd/C lo cual corresponde al 10% del peso del compuesto 2 y se agitó en sólido para que tanto el compuesto como el catalizador se mezclara bien. Luego, se añadió metanol hasta la mitad del vaso Paar y se hidrogenó

durante 40 min. Pasado este tiempo, se eliminó el catalizador de la mezcla de reacción por medio de una filtración con embudo de vidrio poroso y el filtrado obtenido se concentró a presión reducida a 40°C. Finalmente, el sólido resultante se lavó con acetona para eliminar impurezas. Se obtuvieron 0.135 g de un sólido café lo cual corresponde al 45.9% de rendimiento.

Rf:0.1 Sistema:I Pf: 255.1-253.2 °C

Síntesis de 3-(acetilamino)-N-(2,4-diaminoquinazolin-6-il) benzamida (NICQ1)



a: PyBOP b: TEA

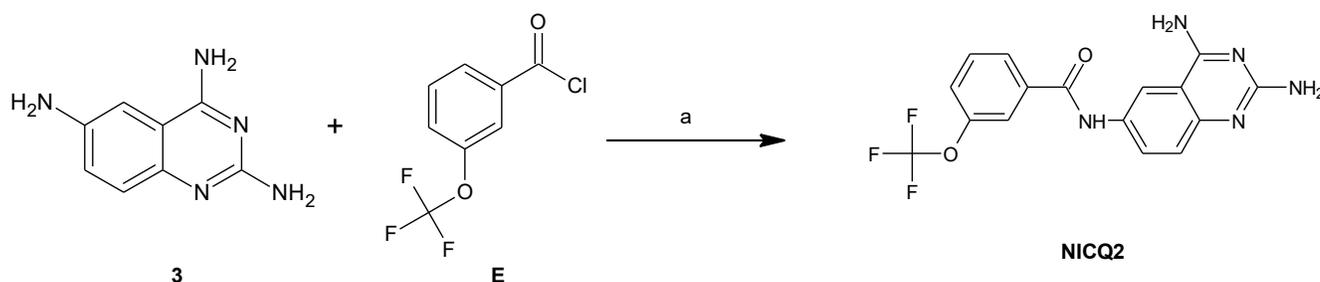
En un matraz bola de 100 mL se agregaron 0.0944 g (0.68 mmol) de ácido 3-acetilaminobenzoico (1) y 5 mL de acetonitrilo anhidro, posteriormente se añadieron 155µL de trietilamina (TEA), 0.3431 g (0.65 mmol) de hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-oxitripirrolidiniofosfonio (PyBOP) y se dejó el matraz en agitación constante a temperatura ambiente con una trampa anhidra y rodeado de papel aluminio para proteger de la luz durante 10 min. Pasado este tiempo, se agregaron 0.097 g (0.55 mmol) de quinazolin-2,4,6-triamina (3) y se dejó en agitación continua y temperatura constante durante 24 h. Después de este tiempo, se observó la formación de un precipitado café, el cual se filtró al vacío. En lo que respecta a la purificación del compuesto final, se realizó una placa preparativa, para ello, se pesaron 0.051 g del sólido café obtenido por filtración y se disolvieron en 7 mL de metanol. Aparte, en una placa analítica de 1 mm de gel de sílice se midieron 3 cm desde la base y se puso una marca, inmediatamente arriba se midieron 0.5 mm y se colocó otra marca para así hacer el carril en dónde iría la muestra.

La muestra disuelta se aplicó con un capilar a lo largo de toda la placa en los 0.5 mm de carril, y luego se colocó dentro de la cámara de elución con 300 mL de sistema CHCl₃: PrOH (7:3), una vez que la placa eluyó, se sacó del sistema y se raspó con una espátula la sección dónde se encontraba el compuesto de interés y la sílice con el compuesto se colocó en un vaso de precipitados de 50 mL, al cual, se le añadieron 5 mL de metanol, se agitó y

se filtró para remover la sílice. Finalmente se concentró el metanol a presión reducida a 40°C para obtener así un sólido color amarillo. Se obtuvieron 0.012 g, lo cual corresponde a un rendimiento del 6.4%.

Rf: 0.46 Sistema: III Pf:364.1-366.3°C con descomposición

Síntesis de *N*-(2,4-diaminoquinazolin-6-il)-3-(trifluorometoxi)benzamida (NICQ2)

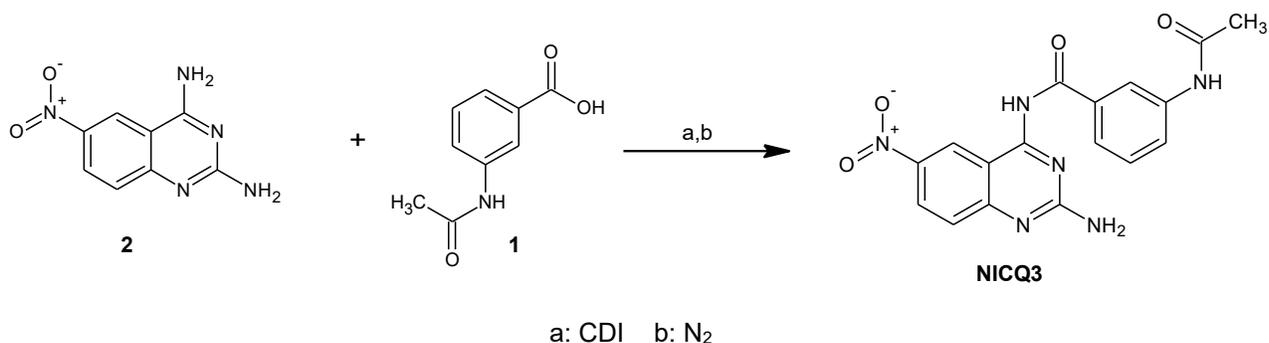


En un matraz de 100 mL se agregaron 2 mL de acetonitrilo y 140 µL (0.100g/ 0.44 mmol) de cloruro de 3-(trifluorometoxi)benzoilo (E). El matraz se colocó en un baño de hielo y se dejó en agitación durante unos minutos para que se enfriara la mezcla, luego, se agregaron 250 µL de trietilamina (TEA) y 0.074 g (0.42 mmol) de quinazolin-2,4,6-triamina (3). Posteriormente el baño de hielo se retiró y se dejó reaccionar con agitación constante, temperatura ambiente y una trampa anhidra durante 24 h. Pasado este tiempo, se concentró el disolvente a presión reducida a 40°C con un rota-evaporador y se obtuvo un sólido color naranja.

Para purificar el compuesto final se empleó carbón activado, de esta manera se pesaron 0.0101 g de carbón activado en un vaso de precipitados de 50 mL, el sólido naranja se disolvió en 5 mL de metanol y se mezcló con el carbón activado. Luego, se filtró la mezcla con un embudo de vidrio poroso para eliminar el carbón activado. El filtrado se concentró a presión reducida y se recristalizó con diclorometano, el sólido resultante se filtró al vacío. Se obtuvieron 0.0631 g lo cual equivale al 41.2% de rendimiento.

Rf: 0.30 Sistema: I Pf:355.4-357.1 °C con descomposición

Síntesis de 3-(acetilamino)-N-(2-amino-6-nitroquinazolin-4-il)benzamida (NICQ3)



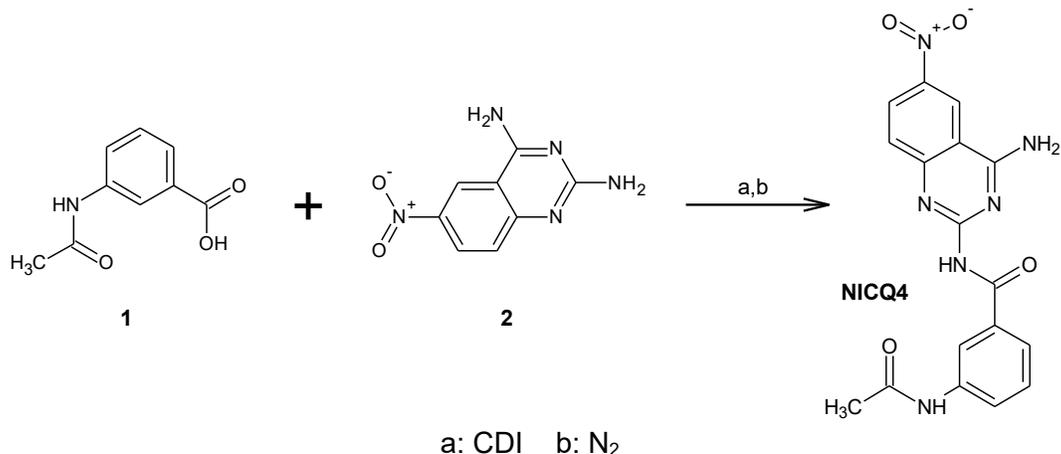
Para realizar la activación del ácido, primero, en un matraz bola de 100 mL se colocaron 0.097 g (0.059 mmol) de 1,1'-carbonyldimidazol (CDI) y 0.076 g (0.424 mmol) de ácido 3-acetaminobenzoico (1), se añadieron 5 mL de acetonitrilo anhidro, una barra de agitación magnética y se purgó el matraz con vacío, posteriormente se tapó con un septo para mantener condiciones anhidras y se puso un globo con nitrógeno. La mezcla de reacción se mantuvo en agitación constante, en condiciones anhidras y a temperatura ambiente durante 2 h. Pasado este tiempo, se realizó una placa de cromatografía en capa delgada para el seguimiento de la reacción y en ella se comprobó la activación del ácido. Luego, en el mismo matraz se agregaron 0.037 g (0.180 mmol) de 2,4-diamino-6-nitroquinazolina (2), se purgó el matraz, nuevamente se colocó el septo y el globo con nitrógeno y se dejó reaccionar en agitación constante y temperatura ambiente durante 24 h. Después de éste tiempo, se observó la presencia de un sólido naranja que resultó ser 2,4-diamino-6-nitroquinazolina (2), el sólido se filtró al vacío y el filtrado se concentró a 40°C con un rotaevaporador en un matraz bola de 100 mL, así pues, se obtuvo un líquido de aspecto resinoso color amarillo que aún tenía 2,4-diamino-6-nitroquinazolina (2), por lo que se recristalizó con acetonitrilo, el sólido obtenido se filtró y el filtrado volvió a concentrarse a 40°C con un rotaevaporador en un matraz bola de 100 mL. Se obtuvo nuevamente un líquido color amarillo de aspecto resinoso pero esta vez únicamente con el producto final, de manera que se añadieron 0.5 mL de acetonitrilo frío y el matraz en el que estaba la muestra se mantuvo en un baño de hielo hasta observar la formación de un sólido color amarillo, el cual, se filtró al vacío. Se obtuvieron 0.0151 g del sólido, lo cual equivale a un rendimiento del 22.9%.

Rf: 0.40

Sistema: III

Pf: 223-224.5 °C con descomposición

Síntesis de 3-acetilamino-*N*-(4-amino-6-nitroquinazolin-2-il)benzamida (**NICQ4**)



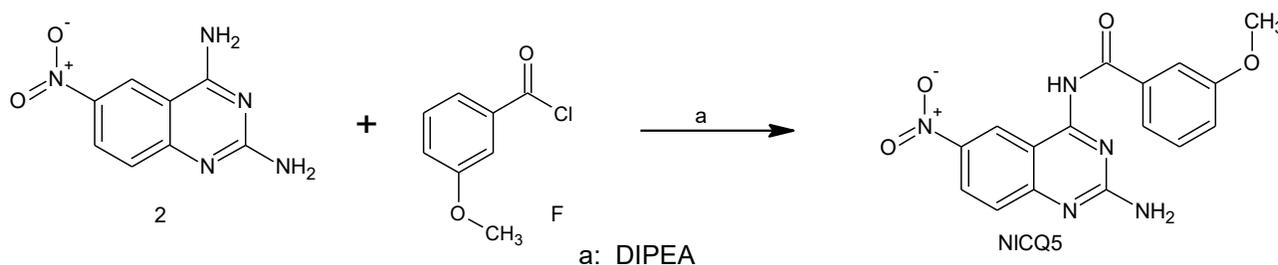
Para realizar la activación del ácido, primero, en un matraz bola de 50 mL, se colocaron 0.140 g (0.860 mmol) de 1,1'-carbonildiimidazol (CDI) y 0.0513 g (0.286 mmol) de ácido 3-acetamidobenzoico (1), se añadieron 3 mL de acetonitrilo, una barra de agitación magnética y se purgó el matraz, posteriormente se tapó con un septo para mantener condiciones anhidras. y se puso un globo con nitrógeno. La mezcla de reacción se mantuvo en agitación constante, en condiciones anhidras y a temperatura ambiente durante 2 h. Pasado este tiempo, se realizó una placa de cromatografía en capa delgada para el seguimiento de la reacción y en ella se comprobó la activación del ácido.

En otro matraz, se agregaron 0.086 g (0.419 mmol) de 2,4-diamino-6-nitroquinazolina (2), 15 mL de DMF anhidra y una barra de agitación magnética, se tapó con un septo y se agitó en hasta que todo el sólido quedó disuelto, luego se agregó al matraz que tenía el ácido activado y se dejó reaccionar durante 24 h con agitación constante, temperatura ambiente y con atmósfera de nitrógeno. Después de este tiempo se observó la presencia de un sólido naranja que resultó ser 2,4-diamino-6-nitroquinazolina (2) sin reaccionar, este sólido se filtró al vacío y el filtrado se concentró a 40°C y presión reducida con un rotaevaporador en un matraz bola de 50 mL. Se obtuvieron 0.0351 g de un líquido color naranja de aspecto resinoso correspondientes a 33.5 % de rendimiento.

Rf: 0.66

Sistema: III

Síntesis de *N*-(2-amino-6-nitroquinazolin-4-il)-3-metoxibenzamida. (NICQ5)



En un matraz bola de 100 mL, se agregaron 0.0523 g (0.254 mmol) de 2,4-diamino-6-nitroquinazolina, 7 mL de acetonitrilo y una barra de agitación, además se adaptó un embudo de adición y una trampa anhidra. El matraz y el resto del sistema se colocaron en un baño de hielo y se inició la agitación de la mezcla. Luego, se añadieron 150 μ L (0.849 mmol) de *N*-*N'*-diisopropiletilamina (DIPEA).

Por otra parte, se midió 1 mL de acetonitrilo, el cual se colocó en el embudo de adición junto con 60 μ L (0.072 g/0.42 mmol) de cloruro de 3-metoxibenzoilo (F), esta mezcla se añadió a la mezcla de reacción gota a gota con el embudo de adición, una vez agregado el reactivo F, se retiró el baño de hielo y se dejó agitar la mezcla de reacción durante 24 h. Pasado este tiempo se observó la presencia de un sólido naranja correspondiente a 2,4-diamino-6-nitroquinazolina sin reaccionar. Este sólido se filtró al vacío y el filtrado se concentró a 40°C con un rotaevaporador en un matraz bola de 100 mL y se obtuvo un líquido de aspecto resinoso color naranja. Para obtener el compuesto final puro se realizó una percolación con gel de sílice flash, para lo cual se empleó un embudo de vidrio poroso en el que se colocó inicialmente papel filtro, seguido por una capa de 2 cm de gel de sílice y finalmente otro papel filtro. El líquido obtenido después de concentrar se disolvió en 2 mL de cloroformo y se pasó a través del sistema de percolación al vacío, se añadieron aproximadamente 4 mL más de cloroformo y el filtrado obtenido se concentró a 40°C con un rotaevaporador en un matraz de 100 mL para así obtener un sólido color amarillo. Se obtuvieron 0.0225 g del compuesto final, correspondiente al 15.8 % de rendimiento.

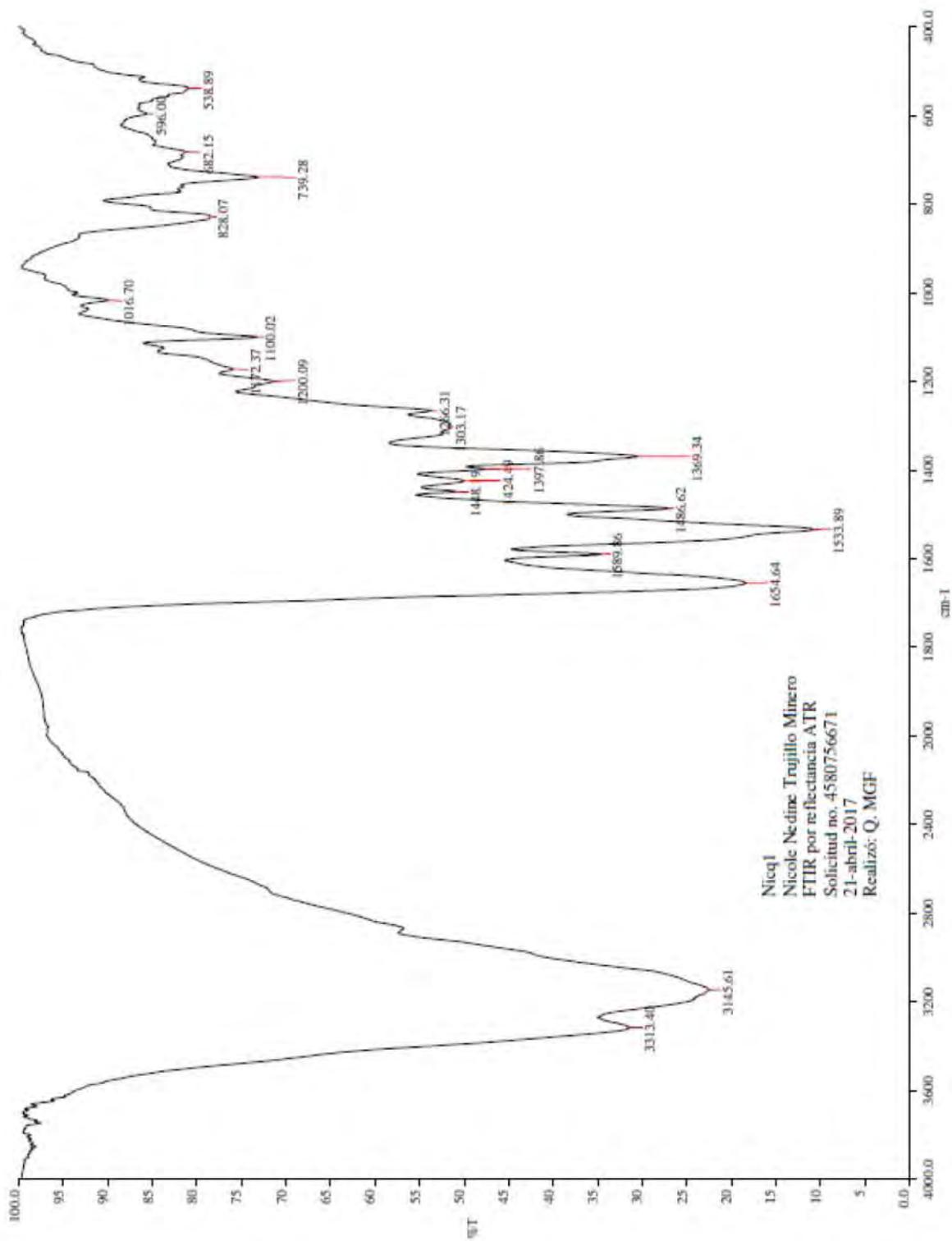
Rf: 0.58

Sistema: II

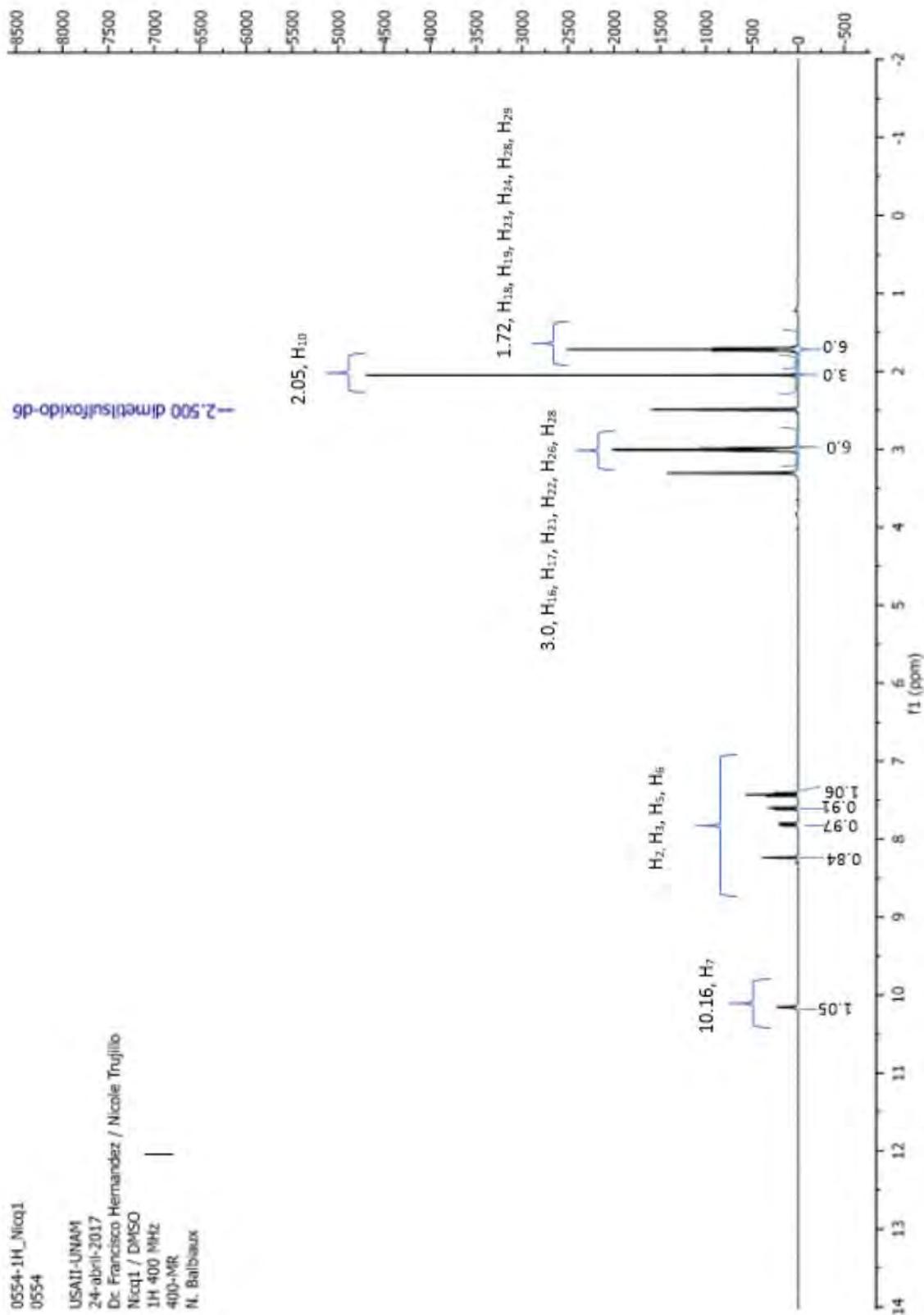
Pf: 245.2-246.6 °C

APÉNDICE II. COLECCIÓN DE ESPECTROS IR Y RMN-¹H.

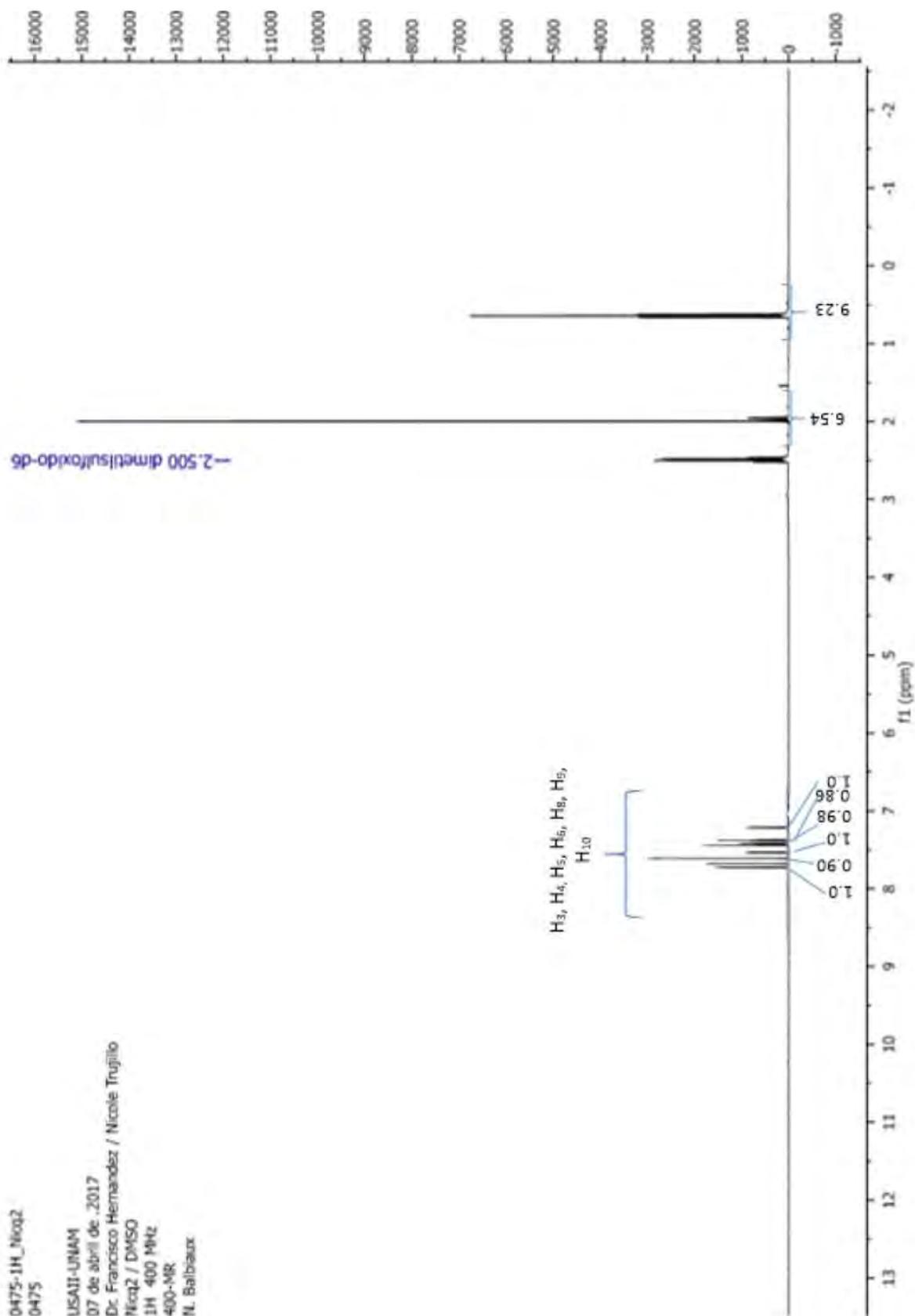
Espectro IR del compuesto **NICQ1**



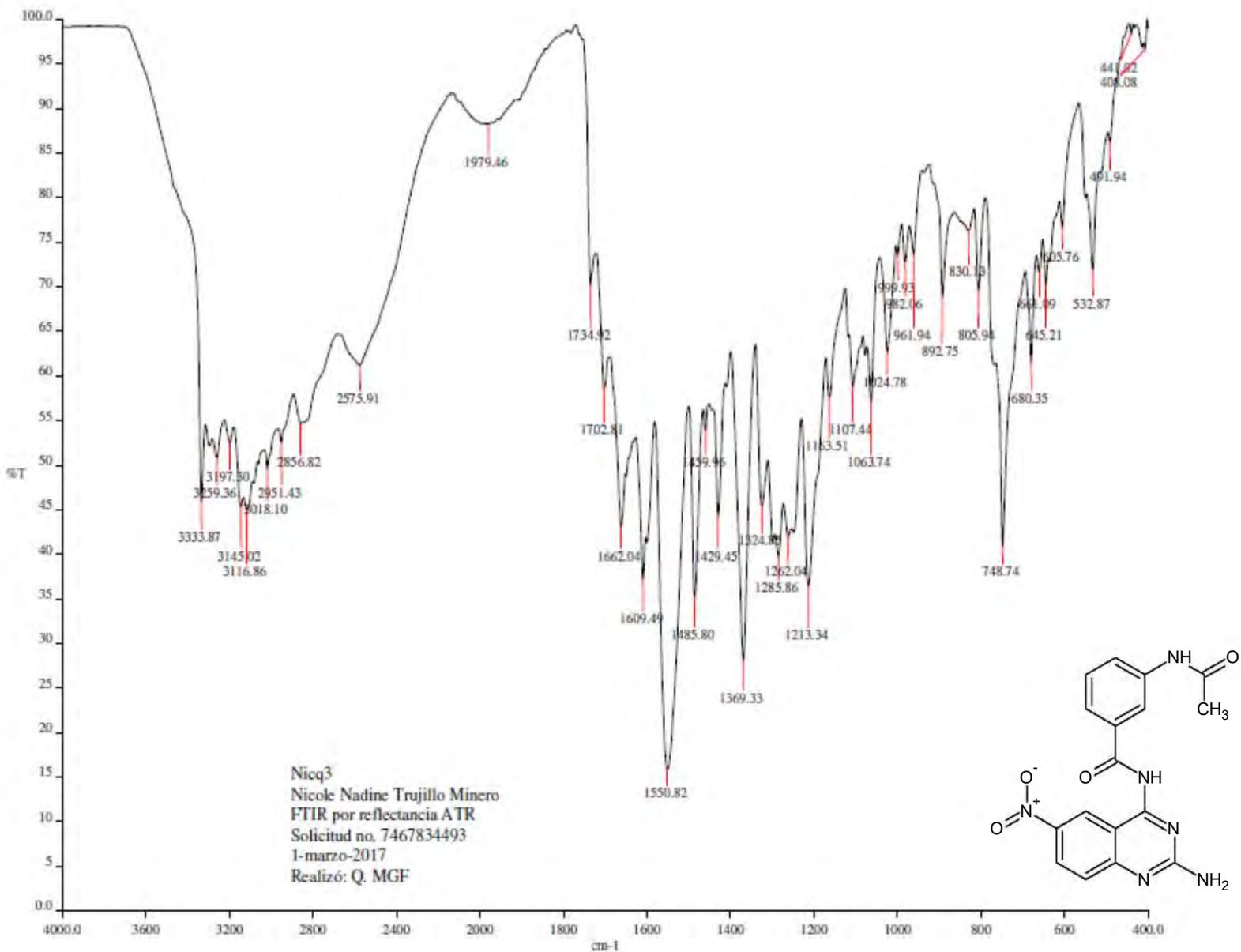
Espectro de RMN- ¹H para el compuesto **NICQ1**



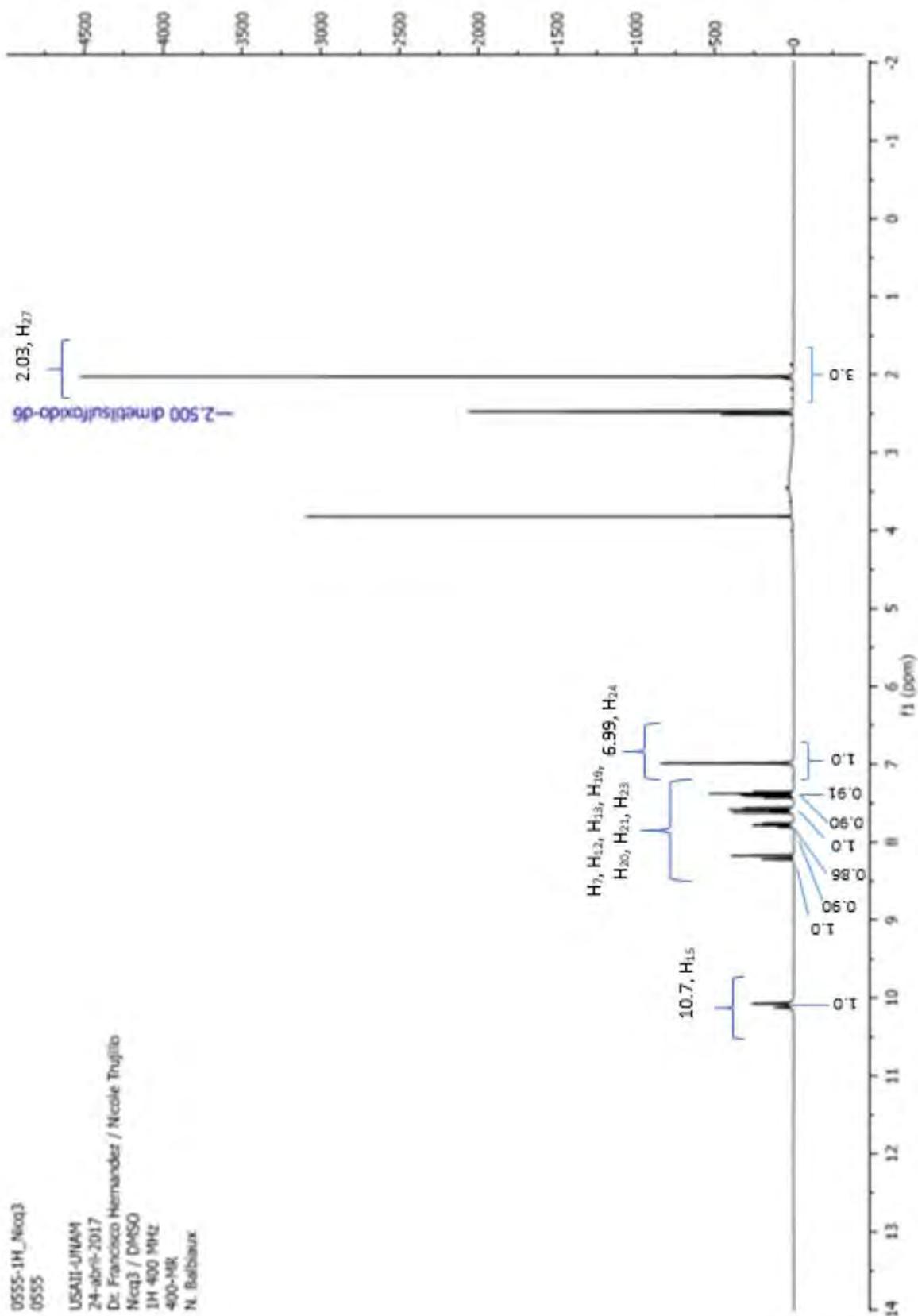
Espectro de RMN- ¹H para el compuesto **NICQ2**



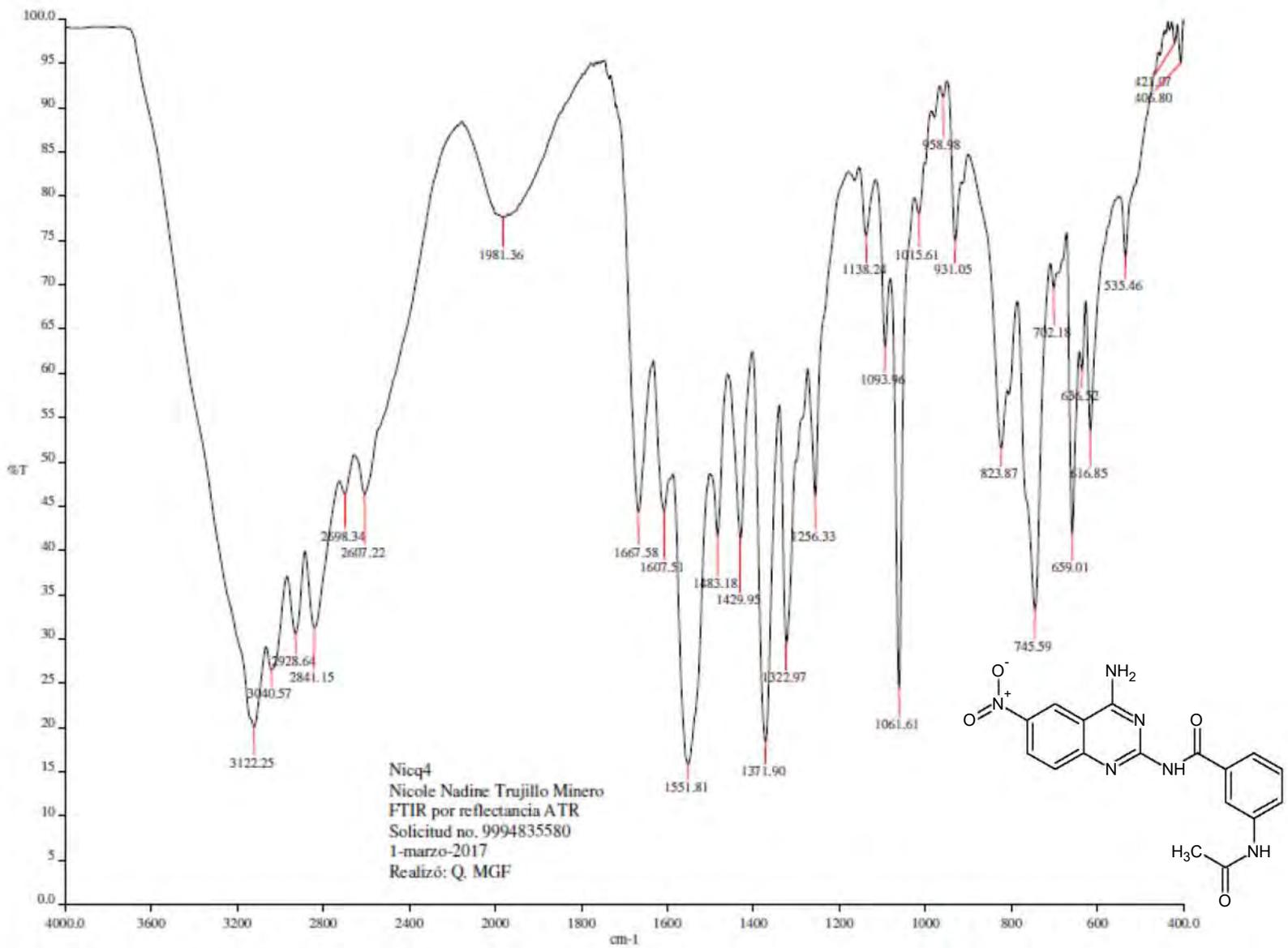
Espectro IR del compuesto **Nicq3**



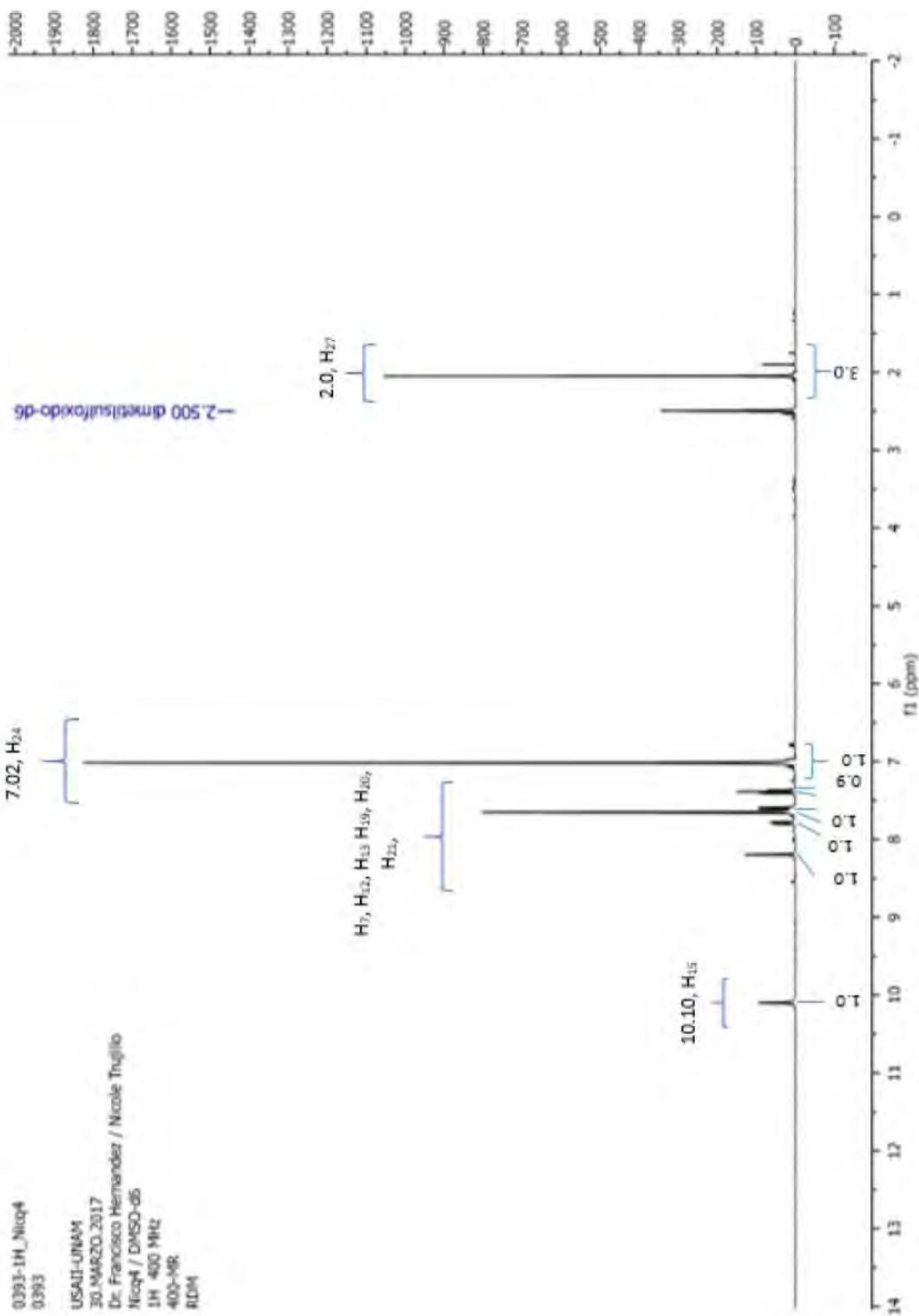
Espectro de RMN- ¹H para el compuesto **NICQ3**



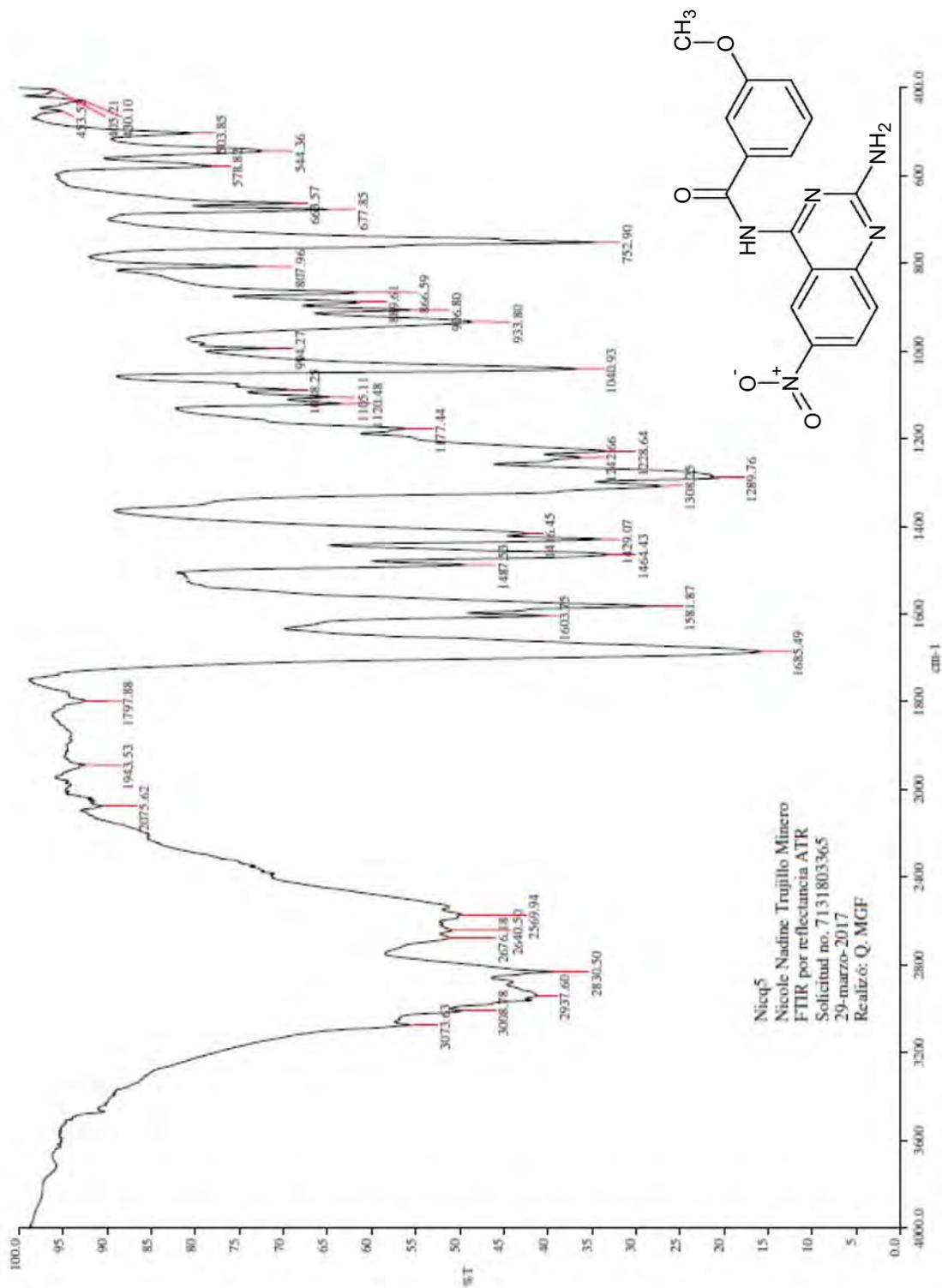
Espectro IR del compuesto **NICQ4**



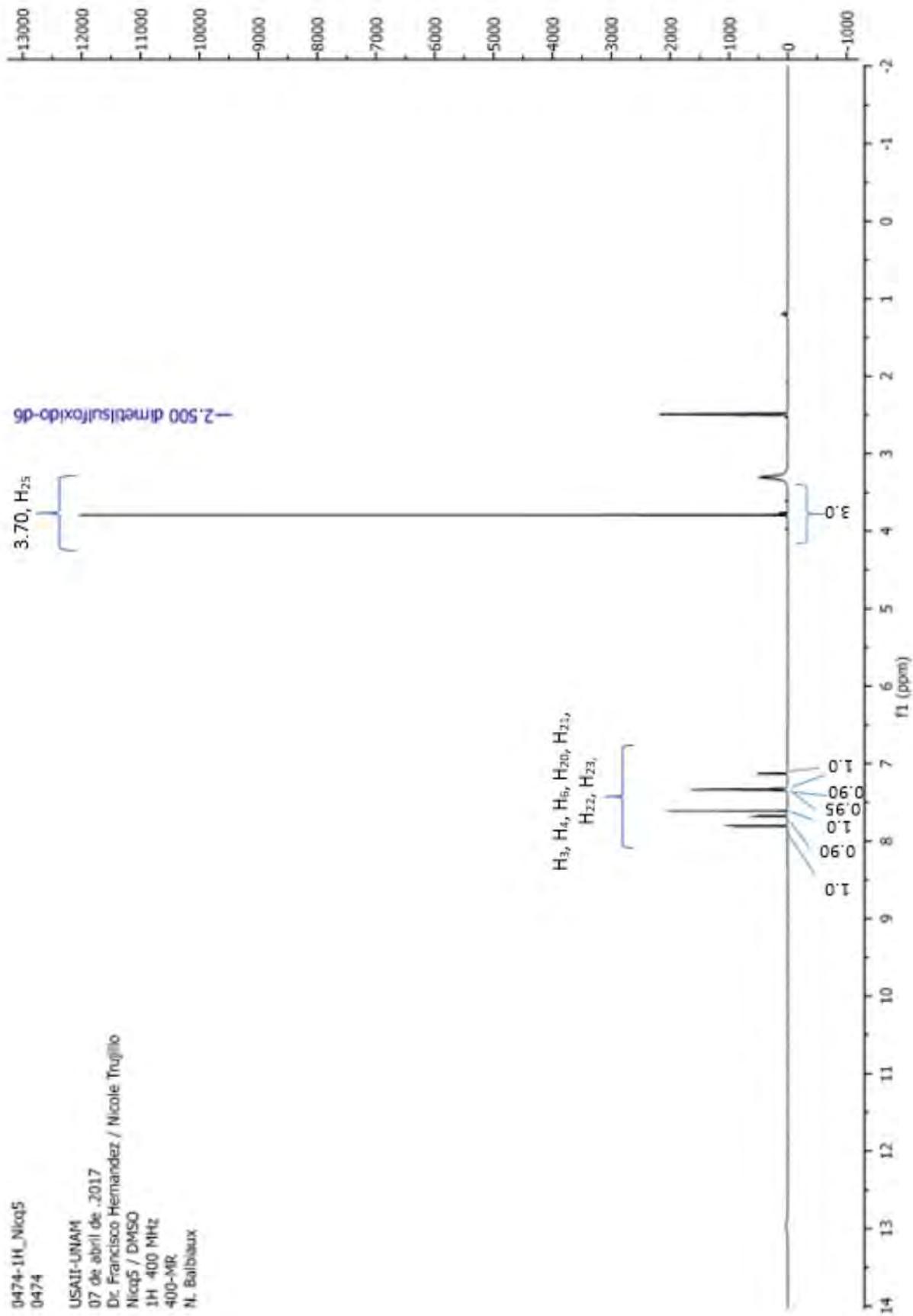
Espectro de RMN- ¹H para el compuesto **NICQ4**



Espectro IR del compuesto NICQ5



Espectro de RMN- ¹H para el compuesto **NICQ5**



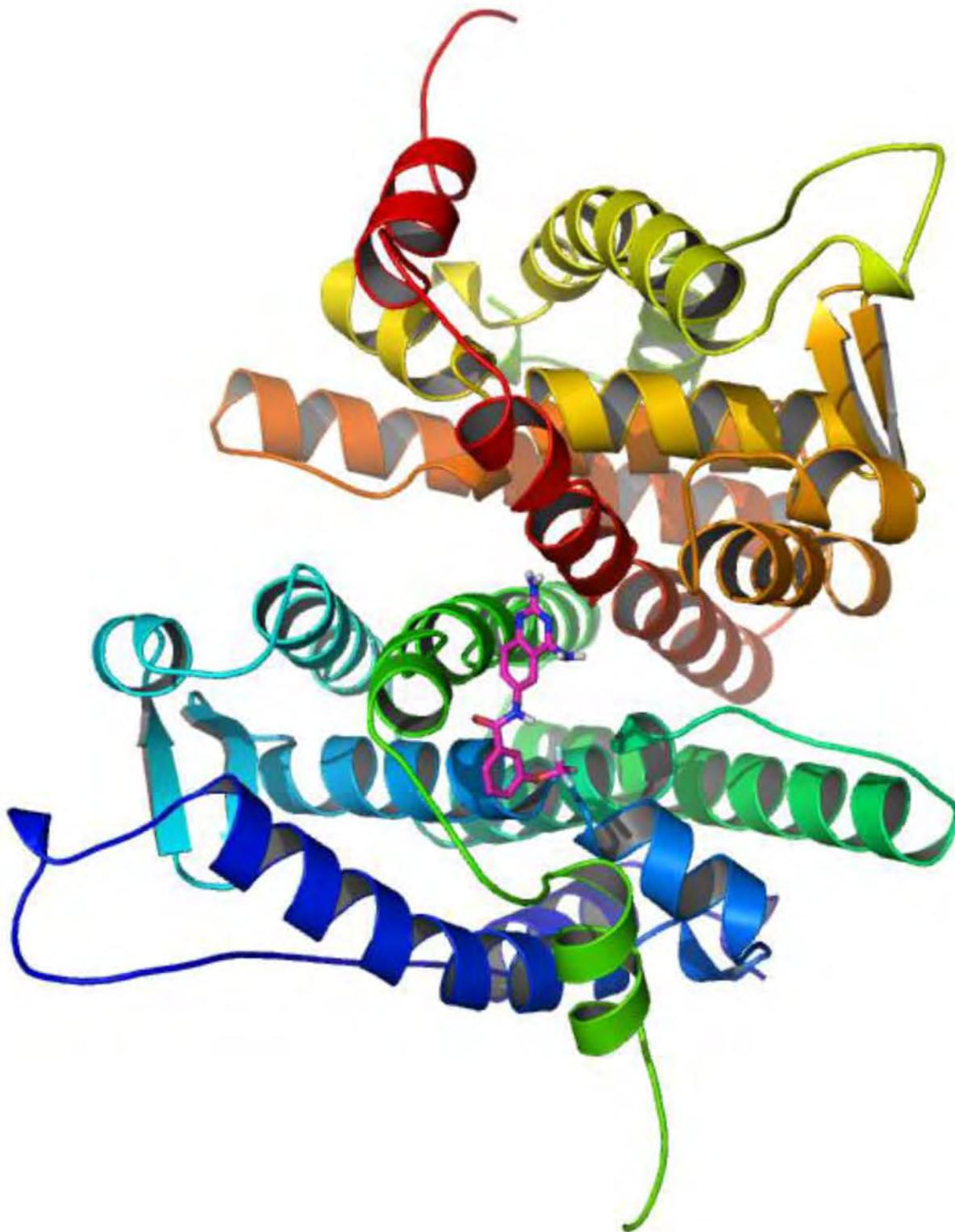
APÉNDICE III. ACOPLAMIENTOS MOLECULARES

Acoplamiento molecular del compuesto **NICQ1** con el dominio de unión a ligando del receptor estrogénico alfa humano (ER- α).

A



Acoplamiento molecular del compuesto **NICQ2** con el dominio de unión a ligando del receptor estrogénico alfa humano (ER- α).



Acoplamiento molecular del compuesto **NICQ3** con el dominio de unión a ligando del receptor estrogénico alfa humano (ER- α).



Acoplamiento molecular del compuesto **NICQ4** con el dominio de unión a ligando del receptor estrogénico alfa humano (ER- α).



Acoplamiento molecular del compuesto **NICQ5** con el dominio de unión a ligando del receptor estrogénico alfa humano (ER- α).

