



UNIVERSIDAD DE CHILE
Facultad De Ciencias Químicas Y Farmacéuticas
Departamento de Química Orgánica y Físico Química

ESTUDIO DE LA ACCIÓN INHIBITORIA DE LA RESPIRACIÓN Y CRECIMIENTO CELULAR DE HIDROQUINONAS TRI- Y TETRACÍCLICAS

Directores de Tesis

Dr. Ramiro Araya Maturana.
Depto. de Química Orgánica y
Físico Química

Dr. Jorge Ferreira Parker.
Instituto de Ciencias Biomédicas.
Laboratorio de Bioenergética y Cáncer.

TESIS
PARA OPTAR AL TÍTULO DE QUÍMICO FARMACÉUTICO

LUIS ACEVEDO ARÉVALO

Santiago, Chile
2011

Índice

Portada	I
Índice	II
Lista abreviaturas	IV
Resumen	V
Introducción	1
Antecedentes generales.....	1
Objetivos generales.....	5
Objetivos específicos.....	5
Compuestos estudiados.....	6
Materiales y métodos	7
Materiales, equipos y reactivos.....	7
Material biológico.....	7
Equipos.....	7
Reactivos.....	8
Métodos.....	8
Mantenimiento y propagación de células.....	8
Protocolo de tripsinización.....	10
Método de descongelación celular.....	10
Recolección de células.....	11
Medición de la concentración de proteínas.....	12
Medición del consumo de oxígeno (respiración celular).....	12
Cultivo de células.....	13

Resultados	15
Efecto de la concentración de los compuestos en estudio sobre el crecimiento de líneas celulares TA3, TA3-MTX-R, CEM/C2, CCRF-CEM y VERO.....	15
Efecto sobre el crecimiento de líneas celulares TA3 y su variante resistente TA3-MTX-R	15
Efecto sobre el crecimiento de líneas celulares CCRF-CEM y su variante resistente CEM/C2.....	22
Efecto sobre el crecimiento de la línea celular VERO.....	28
Efecto de los compuestos en estudio sobre la respiración de células tumorales TA3 Y TA3-MTX-R.....	33
Efecto de los compuestos sobre la respiración de células tumorales TA3 Y TA3-MTX-R en ausencia de CCCP.....	35
Efecto de los compuestos sobre la respiración de células tumorales TA3 Y TA3-MTX-R en presencia de CCCP.....	38
Discusión	43
Conclusión	52
Referencias	55

Abreviaturas

PBS : Solución salina tampón fosfato pH 7,4.

DMEM : Medio mínimo esencial de Dulbecco.

RPMI 1640: Medio de cultivo (*Roswell Park Memorial Institute médium*).

DMSO: Dimetilsulfóxido.

FBS : Suero bovino fetal.

HEPES: Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazina-etanosulfónico.

IC₅₀: Concentración necesaria para inhibir el 50% del consumo de oxígeno o crecimiento celular.

CCCP: Carbonil-cianuro-*m*-clorofenilhidrazona.

DA2P2: 9,10-dihidroxi-8-(hidroximetil)-4,4-dimetil-ciclohexil[*h*]-5,8-dihidroantracén-1(4*H*)-ona.

DA2P1: 9,10-dihidroxi-5-(hidroximetil)-4,4-dimetil-ciclohexil[*j*]-5,8-dihidroantracén-1(4*H*)-ona.

DA1: 9,10-dihidroxi-8,8-dimetil-5-oxo-ciclohexil[*c*]-1,4,5,8-tetrahidroantracén-1-il acetato.

RAM7: 9,10-dihidroxi-5-(hidroximetil)-4,4,8-trimetil-5,8-dihidroantracén-1(4*H*)-ona.

RAM9: 9,10-dihidroxi-8-(hidroximetil)-4,4,5-trimetil-5,8-dihidroantracén-1(4*H*)-ona.

DA7P1: 4,4-dietil-9,10-dihidroxi-5-(hidroximetil)-ciclohexil[*j*]-5,8-dihidroantracén-1(4*H*)-ona.

Resumen

En estudios anteriores se ha observado que algunas hidroquinonas, que poseen un núcleo naftaleno con la característica de tener el grupo hidroxilo conjugado con un sustituyente carbonilo, presentan actividad antitumoral. En este trabajo se muestran los efectos de una serie de hidroquinonas tricíclicas y tetracíclicas relacionadas estructuralmente. Los resultados sobre la viabilidad celular se obtuvieron a través de técnicas colorimétricas con MTT en las células tumorales : de adenocarcinoma mamario de ratón TA3 y su variante multirresistente TA3-MTX-R además de leucémicas de linfoblasto agudo CCRF-CEM y su variante resistente CEM/C2. También se realizaron ensayos en las células normales VERO. Complementariamente, se realizaron mediciones polarográficas para establecer la capacidad inhibitoria de los compuestos sobre la respiración celular de las células tumorales TA3 y TA3-MTX-R. La mayor potencia la mostró una de las hidroquinonas tricíclicas, DA7P1, obteniendo con ella inhibiciones a concentraciones del orden μM .

Introducción

1.1 Antecedentes generales

Los compuestos fenólicos presentan en su estructura al menos un anillo aromático y uno ó más grupos hidroxilos.¹ Dentro de los fenoles de origen vegetal se pueden encontrar diferentes estructuras, con más de 8.000 compuestos distintos.²

A estos compuestos se les ha atribuido una diversidad de actividades biológicas, tales como: antihelmíntica, antihepatotóxica, antiinflamatoria, antidiarreica, antiulcerosa, antiviral, antialérgica, vasodilatadora y antienvjecimiento,^{3,4} entre otras. También los fenoles son conocidos por su actividad anticarcinogénica o antitumorígenica.^{5,6} Incluso se ha informado que este tipo de compuestos poseen propiedades antiproliferativas y citotóxicas en varias líneas de células tumorales.⁷⁻¹²

A los compuestos fenólicos se les ha atribuido la capacidad de inhibir o estimular el daño oxidativo a biomoléculas, esto quiere decir que pueden comportarse como antioxidantes o pro-oxidantes.^{13-16, 17-20} Los antioxidantes son definidos como sustancias que, cuando presentan una baja concentración comparada con la de los sustratos oxidables, retrasan significativamente o previenen su oxidación.^{21,22} Esta propiedad de los compuestos fenólicos se ha asociado a su capacidad para eliminar los radicales libres y de inhibir los citocromos P450 o enzimas con actividad oxidante como las ciclooxigenasas y las lipooxigenasas.²³

En relación a la capacidad pro-oxidante se ha manifestado que, a altas dosis, los polifenoles pueden actuar produciendo especies reactivas de oxígeno (ROS),²⁴ y es sabido que reacciones de radicales libres y especies reactivas de oxígeno con moléculas biológicas, en vivo, juegan un papel importante en muchas enfermedades, una de ellas es el cáncer.^{25,26} Las ROS son entidades que contienen uno o más átomos de oxígeno reactivo incluyendo al radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$) el radical anión superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), y el

peróxido de hidrógeno (H_2O_2), su formación es una consecuencia inevitable de la respiración en organismos aeróbicos. En la mitocondria se generan la mayoría de especies reactivas de oxígeno como subproducto de la fosforilación oxidativa. Se sabe que, del 1 al 3% del oxígeno consumido por la mitocondria no es completamente reducido, generándose radicales de oxígeno.²⁷ Las ROS son especies muy inestables y reaccionan rápidamente con otras sustancias en el cuerpo. La actividad citotóxica de los compuestos fenólicos es posible asociarla a su capacidad pro-oxidante acelerando el daño oxidativo al ADN, proteínas y carbohidratos.^{13-16,28} Se ha señalado que algunos fenoles, debido a su actividad pro-oxidante, intervienen en vías bioquímicas esenciales que involucran topoisomerasas, prostanoïdes y traducción de señales.^{29,30} Se cree que un grupo aril cetona fenolico se encuentra presente en muchos compuestos con actividad biológica, y se ha sugerido que su presencia es crítica en la actividad mutagénica.³¹

Existen dos mecanismos plausibles que pueden explicar la formación de radicales libres derivados de compuestos fenólicos: La abstracción del átomo de hidrógeno desde el grupo hidroxilo presente en los fenoles³² y la oxidación monoelectrónica seguida de la pérdida del protón del grupo hidroxilo.³³

Algunos antioxidantes polifenólicos han exhibido toxicidad dosis dependiente contra células de leucemia promielocitica humana (HL - 60), y se ha sugerido que su toxicidad está relacionada con su carácter pro-oxidante.³⁴ Apoyando esta hipótesis un estudio mostró una inhibición del crecimiento celular de cáncer L1210 la cual ha sido descrita como un ejemplo importante de toxicidad ocurrida vía radical fenoxil.³⁵

Se ha demostrado que la habilidad de los compuestos fenólicos para inhibir el crecimiento y proliferación de ciertas células malignas *in vitro* es fuertemente dependiente de sus características estructurales, de la dosis, de la molécula blanco y el medio en el cual actúan.³⁶⁻³⁸ Otros trabajos muestran que aún cuando, después de la absorción hacia el torrente sanguíneo, los compuestos fenólicos pueden sufrir

modificaciones químicas tales como glicosilación, metilación y glucuronización, su biodisponibilidad y habilidad para ejercer actividad biológica se mantiene.^{39,40}

Han sido materia de estudio varias clases de compuestos químicos capaces de inhibir la respiración celular, con el objetivo de desarrollar agentes antineoplásicos.^{41,42} Hasta la fecha, diversos trabajos han propuesto que muchos de los compuestos fenólicos parecen actuar por inhibición del transporte de electrones mitocondrial^{43,44,45-47} y/o desacoplamiento de la fosforilación oxidativa,^{48,49} existe la teoría que en algunos casos estas actividades son debidas a catecoles, metabolitos de 1,4-hidroquinonas o sus correspondientes radicales semiquinonas, estos últimos se han relacionado con actividad citotóxica^{50,51} y antitumoral,^{51,52} cabe mencionar que los radicales semiquinonas pueden ser formados por reducción de una quinona o debido a la oxidación de una hidroquinona.⁵³⁻⁵⁵

Durante los últimos años, diversos estudios han revelado alteraciones en el número,⁵⁶ la ultraestructura,⁵⁷ el proteoma,⁵⁸ y la actividad de la mitocondria en células cancerosas.⁵⁹ De este modo, se han evidenciado cambios asociados al metabolismo de la mitocondria en el proceso tumoral, uno de estos cambios es una baja tasa de respiración respecto de las células normales,⁶⁰⁻⁶⁵ esto puede ser debido a daño en las mitocondrias o disminución en su número,^{64,65} además se ha visto que el metabolismo mitocondrial está altamente activo, debido al constante crecimiento y proliferación celular.⁶⁶ Por lo tanto, teniendo en cuenta estas características, se puede esperar que las células cancerosas sean más sensibles a la inhibición de la respiración mitocondrial que una célula normal.

En estudios anteriores se ha demostrado que compuestos con un grupo carbonilo en posición *orto* respecto de la función fenol, específicamente la hidroquinona 4,4-dimetil-5,8-dihidroxi-naftalen-1-ona y una serie de derivados inhiben la respiración celular a concentraciones micro- y submicromolares en líneas celulares de tumor mamario de ratón TA3 y su sublínea multirresistente TA3-MTX-R. Se ha sugerido que los radicales

fenoxilo derivados de estos compuestos pueden permanecer dentro de las células con concentraciones suficientes para inhibir la respiración.⁶⁷

Las hidroquinonas sustituidas en la posición *para* se encuentran entre los más potentes antioxidantes y son de especial interés con respecto a la biomédica y la química alimentaria. Las *p*-hidroquinonas son generalmente menos estables termodinámicamente que su forma oxidada, las quinonas. Sin embargo, las quinonas pueden ser efectivamente convertidas en hidroquinonas,^{69,70} y por lo tanto, las *p*-hidroquinonas coexisten con las quinonas en sistemas biológicos. La pronunciada actividad antioxidante de las *p*-hidroquinonas está determinada por su habilidad de terminar las reacciones en cadena de radicales libres debido a su reactividad con radicales lipoperoxidos $LO\cdot$.⁷¹

Para varias *p*-hidroquinonas, ha sido demostrada su capacidad antioxidante en modelos de oxidación de estireno⁷² y en la oxidación de lípidos con importancia biológica en sistemas acuosos microheterogéneos.^{73,74} Respecto al radical semiquinona que se piensa está involucrado en la actividad de estos compuestos un estudio demostró que la capacidad antioxidante del ubiquinol (una *p*-hidroquinona) en la peroxidación de lípidos de membrana está ligada a la existencia de ubisemiquinona (SQ \cdot) como el principal producto de reacción del ubiquinol.⁷⁵

Considerando que la actividad de los compuestos fenólicos sobre la respiración celular involucra un radical fenoxilo, el cual puede ser formado, desde una quinona o hidroquinona, y que su actividad, ya sea inhibición de la respiración o desacoplamiento de la fosforilación oxidativa, se lleva a cabo sobre la mitocondria, se puede inferir que: en la medida que la molécula activa presente una lipofilia adecuada para atravesar las membranas celulares, y si además, se puede estabilizar el radical semiquinona dentro de la célula entonces se obtendría una acción citotóxica más efectiva.

1.2 Objetivos generales

- Estudiar in vitro los compuestos hidroquinónicos de la figura 1.1. sobre células tumorales: TA3, TA3-MTX-R, CCRF7CEM, C2/CEM.
- Estudiar in vitro los compuestos hidroquinónicos de la figura 1.1. sobre células normales VERO.

1.2.1 Objetivos específicos

- Determinar el efecto de la concentración de los compuestos mostrados en la fig. 1.1 sobre la respiración de células tumorales TA3 y TA3-MTX-R.
- Determinar el efecto de la concentración sobre el crecimiento de cultivos celulares de las líneas tumorales TA3, TA3-MTX-R, CCRF7CEM, C2/CEM y la línea VERO.

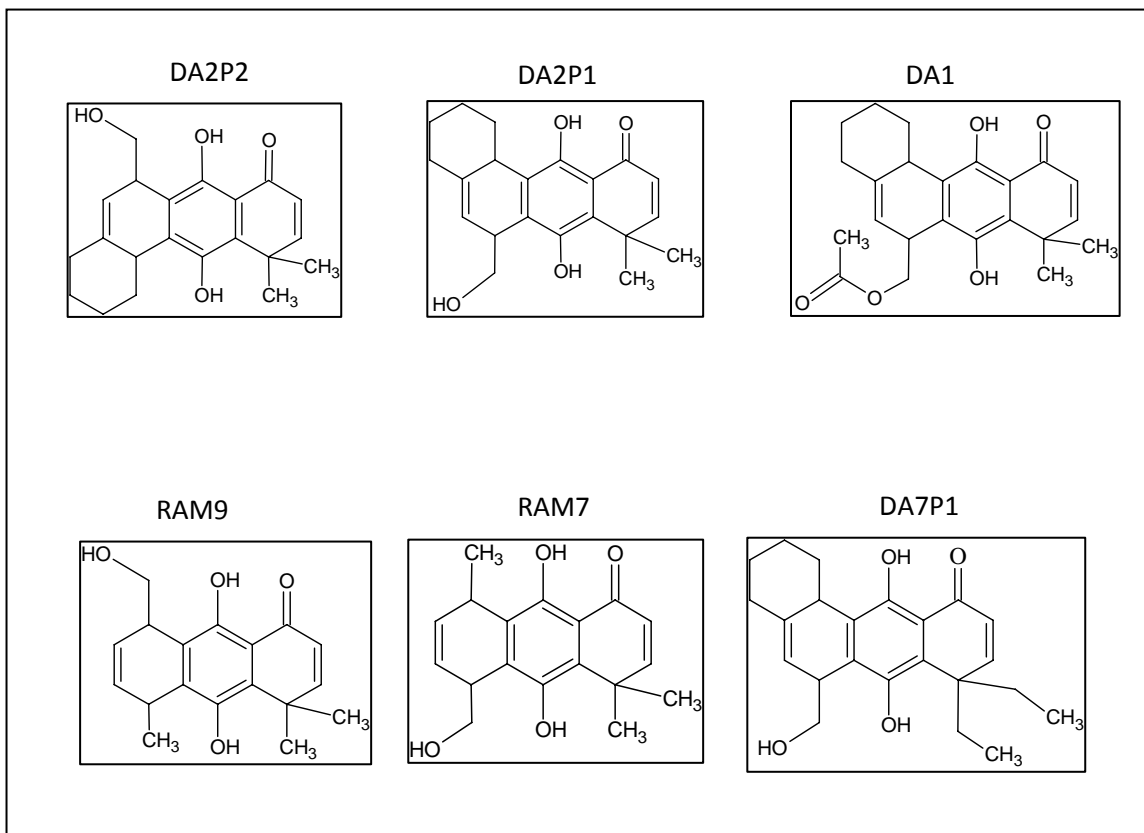


Figura 1.1. Estructura de los compuestos estudiados.

II.- MATERIALES Y MÉTODOS.

2.1. Materiales, equipos y reactivos.

2.1.1. Material biológico.

Las células tumorales correspondientes a las líneas de adenocarcinoma mamario TA3 y su sublínea resistente TA3-MTX-R, fueron obtenidas en la forma de tumores ascíticos, desarrollados por el laboratorio de Bioenergética en ratones de la cepa CAF-1 JAX, que actuaron como portadores de dichas líneas según metodología descrita⁵⁹⁻⁶². La cepa fue proporcionada por el vivero del Instituto de Ciencias Biomédicas de la Facultad de Medicina, División Ciencias Médicas, Universidad de Chile.

Las células VERO, CEM/C2 y CCRF-CEM se obtuvieron de stocks de líneas celulares congeladas conservadas en nitrógeno líquido a -180 °C. Estas líneas celulares fueron obtenidas desde la American Type Culture Collection (ATCC) (USA).

Número ATCC® de células VERO: **CCL-81™**

Número ATCC® de CEM/C2: **CRL-2264™**

Número ATCC® de CCRF-CEM: **CCL-119™**

2.1.2. Equipos.

Los equipos utilizados fueron: Incubadora Precisión Scientific modelo 5410, centrífuga de placa refrigerada marca Hermle modelo Z300K, centrífuga refrigerada marca Sorval modelo RC-2, centrífuga Sorvall Instruments modelo Econospin, centrífuga Heraeus instruments modelo Biofuge 13, microscopio Nikon Japan modelo SE, microscopio invertido Nikon modelo TMS, espectrofotómetro Plus Metertech modelo SP-830, espectrofotómetro de placas ASYS Hitech GmbH modelo Expert Plus, campana de flujo laminar Factomed model VR24242.

Para la medición de oxígeno se utilizó: electrodo tipo Clark N° 5331, amplificador YSI® modelo 53 conectado a un inscriptor Servocordes SR6254, cámara de acrílico de 0.6ml termoregulada, agitador magnético Cole Pamer modelo N°4805.

2.1.3. Reactivos.

El sulfato de estreptomicina (polvo para inyección), la penicilina G sódica (polvo para inyección) fueron obtenidas del laboratorio Chile S.A.

El ácido 4-(2-hidroxiethyl)-1-piperazin-etanosulfónico (HEPES), albúmina de suero bovino, cianocarbonil-*m*-cloro-fenilhidrazona (CCCP), glutamina, medio de cultivo Dulbecco modificado por Eagle (DMEM), medio de cultivo RPMI 1640, MTT (3[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-bromuro de difeniltetrazolio), suero fetal bovino fueron adquiridos en SIGMA CHEMICAL Co.

La solución salina PBS se preparó con reactivos de grado p.a.: 120 mM NaCl , 2.3 mM KCl, 10 mM KH₂PO₄. Se ajustó a pH 7,4.

2.2. Métodos.

2.2.1. Mantenimiento y propagación de células.^{58-61.}

Las células tumorales TA3 Y TA3-MTX-R se propagan semanalmente, en forma de tumor ascítico en ratones de la cepa CAF-1 JAX mediante la inoculación por vía intraperitoneal de 1×10^6 células del carcinoma TA3 a ratones machos jóvenes y 2×10^6 células para la sublínea TA3-MTX-R, mantenidos estos últimos con 2,3 mg/Kg/48hrs. de metotrexato vía intraperitoneal según metodología descrita⁵⁸⁻⁶¹. La sublínea TA3-MTX-R fue seleccionada del carcinoma TA3 mediante trasposos semanales sucesivos del fluido intraperitoneal de ratones tratados por esta misma vía con metotrexato en dosis crecientes⁶⁷. Esta técnica de propagación se utilizó principalmente para la obtención de células destinadas a la medición del consumo de oxígeno, debido a la necesidad de mayores cantidades de células por experimento.

La mantención y propagación de células TA3, TA3-MTX-R, VERO, CEM/C2 y CCRF-CEM utilizadas en la determinación de viabilidad celular mediante el ensayo de MTT, se realizó en placas de petri para cultivo celular desechables, de 10 cm de diámetro estériles.

Las células TA3 y TA3-MTX-R fueron separadas de fluidos ascíticos, de ratones inoculados en el peritoneo, mediante métodos estériles. Para la extracción de las células tumorales se inyectaron 3 mL de suero fisiológico en el peritoneo del ratón y luego se extrajo la solución de células tumorales, fluidos acíticos y suero fisiológico que se depositó en un tubo falcon. En este caso no es necesario hacer más centrifugaciones para remover la contaminación por eritrocitos, debido a que estos no proliferan en el medio de cultivo utilizado para la mantención y propagación.

Las células CCRF-CEM, CEM/C2 y VERO fueron obtenidas de stocks congelados. En el caso particular de la línea celular VERO, por ser células adherentes, fue necesario realizar una tripsinización al stock ya descongelado.

Para todas las células en común, luego de descongelar los stocks de CCRF-CEM, CEM/C2 y VERO y de extraer las células TA3 y TA3-MTX-R, fueron centrifugadas a 3000 rpm por 5 min. En campana de flujo laminar, se descartó el sobrenadante cuidando de no extraer el pellet y se resuspendió en PBS. Se sacó una muestra de 10 μ L y se realizó un conteo simple de las células viables, en cámara de Neubauer, por exclusión con azul de tripán (dilución $\frac{1}{2}$: 10 μ L de solución celular, 10 μ L azul de tripán).

En un falcon de 15 ml se ajustó una alícuota de la suspensión celular en PBS a una concentración de 100.000 células/ml con medio de cultivo DMEM suplementado con HEPES 25mM, suero fetal bovino al 10%, NaHCO_4 44mM, estreptomycin 100 μ g/ml y penicilina G sódica 100 UI/ml a 37°C para las células TA3, TA3-MTX-R, VERO y RPMI suplementado con 1 % de glutamina, 1% de Estreptomycin/Penicilina y 10% de FBS para las células CCRF-CEM, CEM/C2. Un volumen de 10 ml de cada respectiva suspensión final se trasvasa a placas de petri.

Para el mantenimiento de los cultivos celulares, cada 3 días, en función de la confluencia alcanzada en las placas de petri, se determinan las concentraciones celulares correspondientes y, como anteriormente se ha especificado, se ajusta una suspensión de 100.000 cél./ml con medio

nuevo. La apariencia del medio RPMI pasa desde un color rosado-rojo (rojo fenol a pH 7,4) a un color amarillo (rojo fenol a pH 7-6,5). La apariencia del medio DMEM pasa desde un color lila (rojo de metilo a pH 7,4) a un color amarillo (rojo de metilo a pH menor a 7).

Las placas se almacenaron en condiciones constantes en una incubadora a 37 °C, 5% CO₂, 95% de aire y a 1 atm de presión.

2.2.2. Protocolo de tripsinización.

Se retira el sobrenadante de la placa y se agrega 1 ml de solución enzimática (0,25% Tripsina, 0,3 mM EDTA), se deja encubar a 37°C durante 3 minutos. Una vez desprendida la monocapa celular se neutraliza la acción enzimática agregando 1 ml de medio de cultivo DMEM suplementado. Se centrifugan las células y se procede a descartar el sobrenadante sin dañar el pellet, se resuspende en medio DMEM suplementado y se saca una alícuota de 10 µL para realizar recuentos en cámara Neubauer con azul de tripán para finalmente ajustar a las concentraciones necesarias.

La tripsinización se utilizó en la manipulación de las células VERO. Por ser estas células adherentes, fue necesario antes de realizar cualquier dilución o concentración celular primero desprender la monocapa de su contenedor y las células mismas entre ellas a través de la enzima tripsina.

2.2.3. Método de descongelación celular.¹³⁰

Se saca el vial del congelador o tanque de nitrógeno líquido y se coloca en un baño maría a 35-37 °C hasta que se descongela. Se limpia el exterior con alcohol al 70% y se abre el vial en la cámara de flujo laminar. Con ayuda de una pipeta se trasvasa a un falcon y se añaden 4 ml de medio que debe estar a 37 °C, se mezcla bien.

Centrifugar a 800 rpm durante 3-4 min., se descarta el sobrenadante para eliminar el DMSO, previamente añadido en la congelación, que es tóxico. Se añade al medio de cultivo respectivo y suplementado.

Incubar durante 24 hr en estufa a 37 °C bajo 1 atm de presión y una concentración de CO₂ del 5%.

2.2.4. Recolección de células.^{58-61,67,68}

La recolección de las células destinadas a la medición del consumo de oxígeno TA3 y TA3-MTX-R se realizó de acuerdo al método descrito por Moreadith y Fiskum⁶⁸. Las células fueron separadas después de 5-6 días de una inoculación intraperitoneal de los fluidos ascíticos provenientes de los ratones correspondientes. Los ratones se sacrificaron por dislocación cervical. Los fluidos ascíticos fueron removidos mediante una incisión en el abdomen y filtrados a través de una gasa. La cavidad peritoneal se lavó con 5 ml de medio de lavado frío (0-4 °C), que contenía: NaCl 150mM, KCl 5mM y Tris-HCl 10 mM, a pH 7,4. Las células tumorales se lavaron tres veces con el mismo medio, mediante centrifugaciones sucesivas a 180 g durante 5 min. a 4 °C, el sobrenadante fue descartado por aspiración. Se utilizó una centrífuga refrigerada automática marca Sorvall modelo RC-2.

Las células se suspendieron y se centrifugaron nuevamente bajo las mismas condiciones una o dos veces más, hasta remover la contaminación por eritrocitos. Finalmente las células tumorales fueron resuspendidas, en el mismo medio y diluidas a un volumen adecuado para obtener una concentración alrededor de 45-50 mg de proteínas/ml.

Las células TA3 y TA3-MTX-R fueron separadas de los fluidos ascíticos luego de 5-6 días de ser inoculadas, mediante un método de recolección.

La recolección de células TA3, TA3-MTX-R, VERO, CEM/C2 y CCRF-CEM destinadas a la determinación de viabilidad se realizó desde las placas almacenadas en condiciones constantes, descritas en el numeral 2.2.2.

2.2.5. Medición de la concentración de proteínas.⁶⁹

La concentración de proteína para células tumorales TA3 y TA3-MTX-R se determinó mediante el método de Lowry⁶⁹, este consiste en suspender 0,1 ml de la muestra en 1,9 ml de medio Tris, de la cual se tomaron 50 μ L y se completó a 2 ml con agua destilada. Después se agregó 1 ml de reactivo C (0,1 ml de CuSO_4 al 1%, 0,1 ml de tartrato de Na y K al 2% y 9,8 ml de NaCO_3 al 2%). Se dejó incubar por 10 min., luego se adicionó 50 μ L de reactivo de Folin, y se incubó durante 30 min. a T° ambiente. Finalmente se midió la absorbancia a 500 nm.

Para determinar la concentración de proteínas, se utilizó un estándar de albúmina preparado en forma similar. Los resultados se expresaron como mg de proteína por ml (mg/ml).

2.2.6. Medición del consumo de oxígeno (respiración celular).⁵⁸⁻⁶¹

El consumo de oxígeno de células tumorales TA3 y TA3-MTX-R se midió polarográficamente con un electrodo de oxígeno tipo Clark N° 5331 (Yellow Springs Instrument, Yellow Spring, OH, U.S.A.) colocado horizontalmente en una celda de acrílico transparente de un volumen de 0.6 ml, termorregulada a 25 °C y usando un amplificador YSI® modelo 53 conectado a un inscriptor Servocordes SR6254. La diferencia de potencial de entrada es de 100 mV. El medio de reacción de 0.6 ml contiene la misma solución de lavado (NaCl 150mM, KCl 5mM y Tris-HCl 10 mM, a pH 7,4). Se usó esta solución saturada con aire como patrón para calibrar el electrodo de oxígeno a 100% de saturación. La solubilidad del oxígeno del aire en el medio de respiración (agua) a 25 °C y a 718 mm de Hg de presión atmosférica es 271.515 nanomoles de O. El consumo de oxígeno se expresó como nanomoles de O/minuto/mg de proteína.

Como medio de ensayo se usó la misma solución de lavado descrita para la recolección de células tumorales. Como sustrato se adicionó glutamina a una concentración final de 5 mM. El consumo de oxígeno se comenzó a registrar cuando se agregó directamente a la celda una alícuota de 1.7 mg aprox. de proteínas celulares. La medición control correspondió al registro comprendido desde el instante en que fue agregada la alícuota de 1.7 mg aprox. de proteínas celulares hasta que se consumió todo el oxígeno del medio.

Para determinar el efecto de los compuestos en estudio sobre el consumo de oxígeno, se realizó el mismo procedimiento anterior. Consumido el 20% del oxígeno del medio, se agregó una alícuota del compuesto en estudio, repitiendo el proceso para cada medición agregando paulatinamente mayores alícuotas con el objeto de obtener trazos polarográficos del consumo de oxígeno versus la concentración del compuesto.

Como desacoplante se utilizó CCCP 0,14 mM para la línea TA3 y 0.42 mM para la sublínea TA3-MTX-R.

2.2.7. Cultivo de células.⁵⁸⁻⁶¹

Para el cultivo de células se utilizaron multiplacas de 96 pocillos. Se sembraron 100 μ L de una solución 100.000 células/ml en cada pocillo, resultando un número de 10.000 células/pocillo, se dejó la placa con la solución celular en reposo durante 24 hrs. antes de agregar los compuestos a estudiar, periodo en cual se espera que se dupliquen. Se estudiaron en cada experimento seis concentraciones por triplicado de cada compuesto sembrando 3 placas respectivamente para las 24, 48 y 72 hrs.

Las líneas TA3, TA3-MTX-R, VERO, CEM/C2 y CCRF-CEM mantenidas en placas de petri se contaron en una cámara de Neubauer, por exclusión con azul de tripán, se determinaron sus concentraciones y se ajustaron a 100.000 células/ml con medio de cultivo suplementado. Para las líneas celulares TA3, TA3-MTX-R y VERO se utilizó como medio de cultivo DMEM suplementado y para las líneas celulares CEM/C2 y CCRF-CEM se utilizó como medio de cultivo RPMI suplementado.

Las soluciones de las células en suspensión TA3, TA3-MTX-R, CEM/C2 y CCRF-CEM se mantuvieron en cultivo durante 24 hrs en placas de petri. En este periodo se espera que se dupliquen. Luego de pasadas las 24 hrs las placas se agitaron y se alicuotaron las soluciones depositando 990 μ l en tantos eppendorf de 1,5 ml como concentraciones se desearon estudiar de un mismo compuesto. A cada eppendorf se le adicionan 10 μ L de una solución del compuesto en estudio a una concentración, preparada anteriormente, que diluida 100 veces se obtenga la concentración requerida final. Se depositó el contenido de los eppendorf en cada canal

respectivo de una canoa de 12 canales y se procedió a trasvasar con una pipeta multicanal en los respectivos pocillos de la multiplaca.

Al cumplirse los tiempos 24, 48, 72 hrs se centrifugaron la placas, en centrifuga de placas, en campana de flujo laminar se descartó el sobrenadante y se adicionaron 100 μ L de PBS en cada pocillo, se agitó nuevamente y se llevó a centrifugación. Se repite este proceso de lavado 3 veces con PBS hasta que ya no queden trazas de color en en la multiplaca. En el último lavado se descarta el sobrenadante y se adicionan 100 μ L/pocillo de una solución, preparada anteriormente, de MTT 0,5 mg/ml con RPMI sin rojo fenol. Se deja incubar por una hora en condiciones constantes (37 °C, 1 atm, 5% CO₂).

Cumplido el tiempo se observa en microscopio invertido la formación de cristales de formasán. Se agregan 10 μ L de solución solubilizante (tritón x 100 al 10% de HCl 0,01M) y se agita hasta la disolución total de los cristales. Se procede a medir en lector de placas a 570 nm.

Las células VERO se sembraron en multiplaca, 100 μ L de una solución celular 100.000/ml, se dejó incubar por 24 hrs, tiempo durante el cual se espera una duplicación. Pasadas las 24 hrs se descarta el medio suplementado y se agrega nuevo medio suplementado con las concentraciones del compuesto en estudio. Se incuba por 24, 48 y 72 hrs, cuando se cumplen los tiempos se descarta el medio y se realizan 3 lavados sucesivos con PBS hasta desaparición de las trazas de color. Se agrega 100 μ L de una solución de MTT 0,5 mg/ml con RPMI sin rojo fenol. Se deja incubar por una hora en condiciones constantes (37 °C, 1 atm, 5% CO₂). Luego se descarta el medio y se agregan 100 μ L de DMSO por pocillo, se dejan solubilizar los cristales de formasán por 5 minutos a 37 °C y se mide en lector de placa a 570 nm.

En todos los estudios de viabilidad, la primera corrida vertical de la multiplaca se dejó libre para realizar el blanco y la segunda corrida horizontal se sembró con la solución control.

Los lavados consecutivos con PBS se realizaron para eliminar las trazas de compuestos, debido a que los compuestos por si solos reducen el MTT.

III.- RESULTADOS.

3.1 Efecto de la concentración de los compuestos en estudio sobre el crecimiento de líneas celulares TA3, TA3-MTX-R, CEM/C2, CCRF-CEM y VERO.

3.1.1 Efecto sobre el crecimiento de líneas celulares TA3 y variante resistente TA3-MTX-R.

En los estudios de inhibición del crecimiento se obtuvieron valores significativos para los distintos compuestos. Los diferentes cultivos celulares se expusieron por 24, 48 y 72 hrs. a concentraciones crecientes de cada compuesto. El efecto sobre el crecimiento celular se expresó como % de inhibición del crecimiento respecto del control. Se observó que la sobrevivencia de las células es inversa a la concentración de los compuestos y al tiempo de exposición a los mismos.

Los resultados obtenidos con la línea celular de adenocarcinoma mamario de ratón (TA3) y su sublínea multiresistente (TA3-MTX-R) se pueden ver en las figuras 3.1.a, 3.1b y 3.1c donde se muestran las actividades obtenidas a los tiempos 24, 48 y 72 horas. Los gráficos muestran una inhibición creciente al aumentar el tiempo de exposición de las células y la concentración de los compuestos.

Para las comparaciones de los IC_{50} se utilizaron los resultados a las 48 horas de exposición a los compuestos. En la tabla 3.4 se detallan los valores de los IC_{50} y en el gráfico 3.4 se muestra una comparación visual entre los IC_{50} alcanzados.

El compuesto DA7P1 mostró tener el mayor efecto sobre el crecimiento celular, IC_{50} 11.07 y 15.6 μ M para la línea TA3 y para la sublínea TA3-MTX-R respectivamente. El siguiente en efectividad es DA2P1 con unos IC_{50} de 13.98 y 16.98 μ M para la línea TA3 y para la sublínea TA3-MTX-R respectivamente. Los compuestos DA2P2, RAM7 y RAM9 presentan IC_{50} de 15.85, 16.71 y 23.18 μ M para TA3 y 20.6, 32.6 y 35.0 μ M para TA3-MTX-R. El menos activo es DA1, con un IC_{50} 23.4 μ M para TA3 y 36.1 μ M para TA3-MTX-R.

Como anteriormente se expuso, el compuesto DA7P1 es el que presenta mayor potencia en la inhibición del crecimiento celular, aproximadamente el doble de actividad sobre el crecimiento celular, tanto para TA3 como para la variante resistente, respecto de los compuestos DA1, RAM7 y el RAM9. Esto se puede apreciar en el gráfico 3.4. El compuesto DA7P1 posee una actividad incrementada 111% y 131% sobre TA3 y TA3-MTX-R en comparación con la acción inhibitoria de DA1. Considerando el compuesto RAM7, tenemos que DA7P1 muestra una actividad 109% y 124% mayor para TA3 y TA3-MTX-R. Respecto a RAM9 se tiene que la acción sobre las células TA3, por parte de DA7P1, es 111% mayor y sobre la sublínea resistente DA7P1 presenta una actividad inhibitoria 109% mayor que la producida por RAM9. Ahora relativo a los compuestos DA2P2 y DA2P1 la brecha entre los IC_{50} , en comparación con los alcanzado por DA7P1, disminuyen, siendo la actividad de DA7P1 43% y 32% mayor que la expresada por el compuesto DA2P2, correspondiente al compuesto DA2P1 es 26% y 9% mayor. Esto es tanto para TA3 como para TA3-MTX-R respectivamente. La comparación visual es posible verla en el gráfico 3.4.

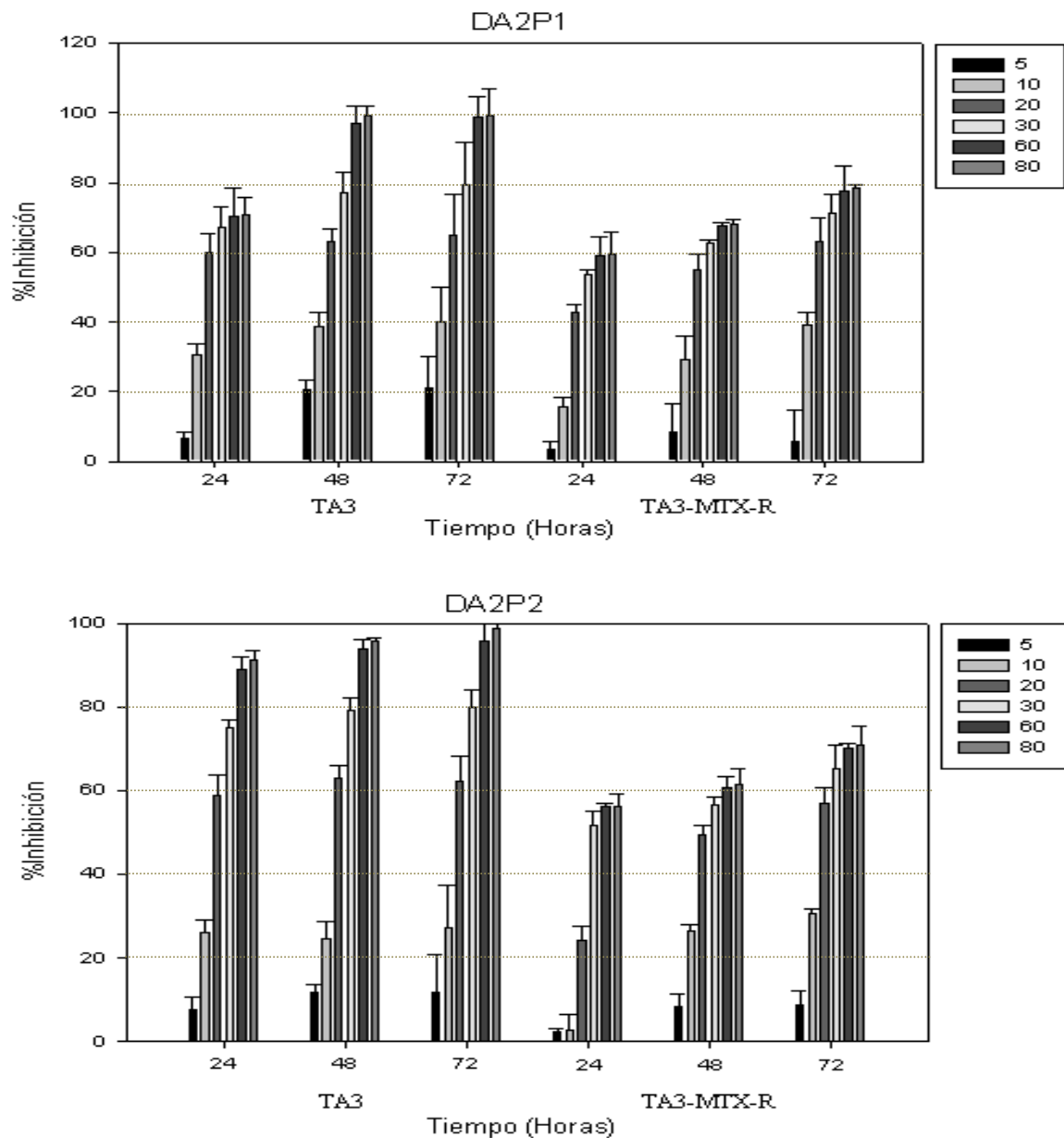


Figura 3.1b. Efecto de DA2P1 y DA2P2 sobre células de adenocarcinoma mamario de ratón de la línea celular TA3 y la sublínea resistente TA3-MTX-R. En el momento de agregar el compuesto la concentración celular es de 200.000 células/ml aproximadamente. Las mediciones se realizaron luego de 24, 48, 72 hrs. de exposición al compuesto. Los resultados se expresan como % de inhibición del crecimiento respecto del control correspondiente. Cada resultado es el promedio de 3 o más experimentos realizados de forma independiente y por triplicado. Los IC_{50} del compuesto DA2P2 a las 24 – 48 – 72 hrs. fueron 16.7 – 15.8 – 15.7 μ M para TA3 y 28.7 – 20.6 – 16.0 para las TA3-MTX-R respectivamente. Los IC_{50} del compuesto DA2P1 a las 24 – 48 – 72 hrs. fueron 14.9 – 13.98 – 13.2 μ M para las TA3 y 44.2 – 16.98 – 13.3 para las TA3-MTX-R respectivamente.

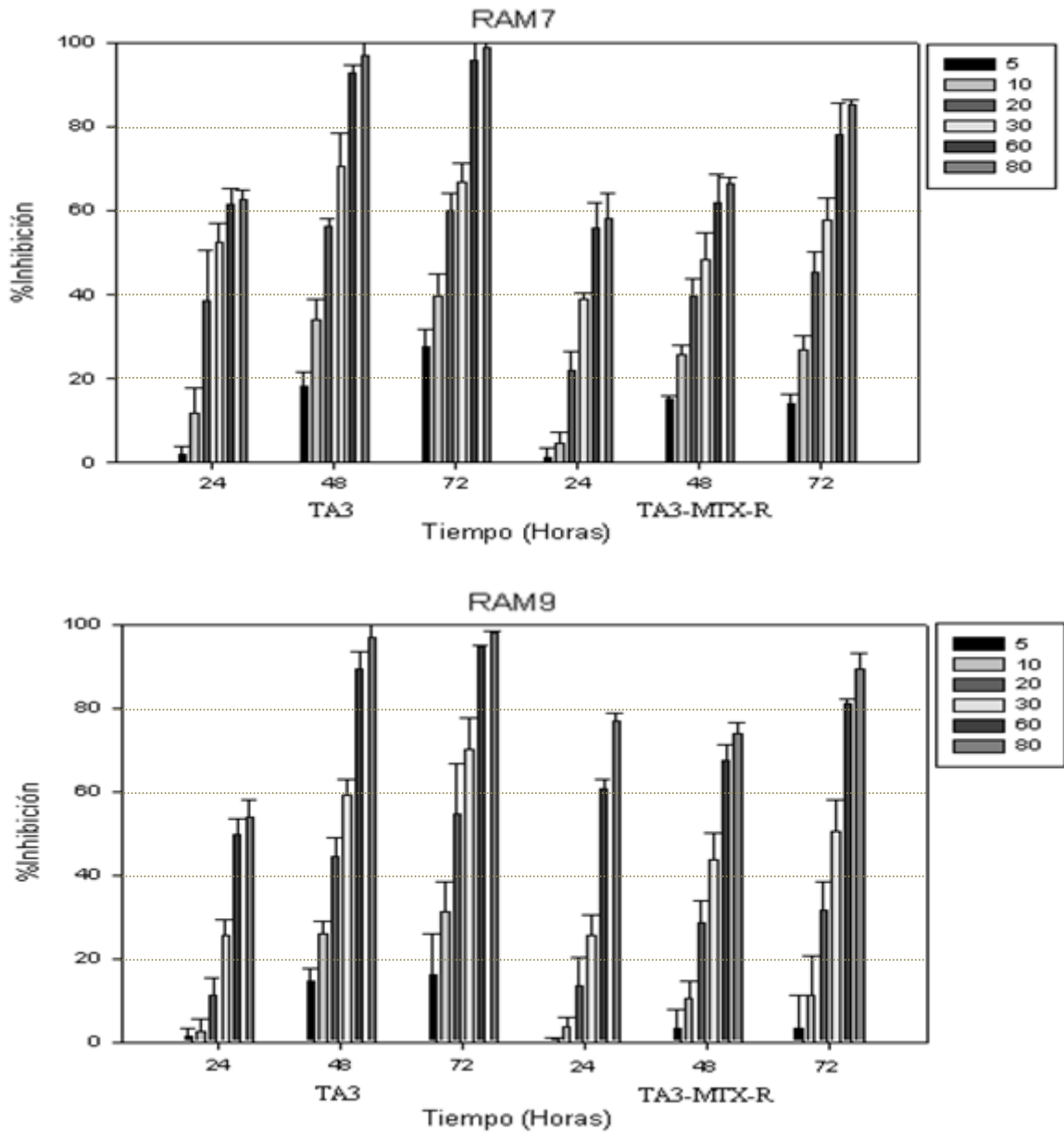


Figura 3.1c. Efecto de RAM7 y RAM9 sobre células de adenocarcinoma mamario de ratón de la línea celular TA3 y la sublínea resistente TA3-MTX-R. En el momento de agregar el compuesto la suspensión celular es de 200.000 células/ml aproximadamente. Las mediciones se realizaron luego de 24, 48 y 72 hrs. de exposición al compuesto. Los resultados se expresan como % de inhibición del crecimiento respecto del control correspondiente. Cada resultado es el promedio de 3 o más experimentos realizados de forma independiente y por triplicado. Los IC_{50} del compuesto RAM7 a las 24 – 48 – 72 hrs. fueron 61.2 – 23.2 – 17.7 μ M para TA3 y 50.8 – 35.0 – 29.7 para las TA3-MTX-R respectivamente. Los IC_{50} del compuesto RAM9 a las 24 – 48 – 72 hrs. fueron 27.5 – 16.7 – 14.97 μ M para las TA3 y 42.5 – 32.6 – 23.44 para las TA3-MTX-R respectivamente.

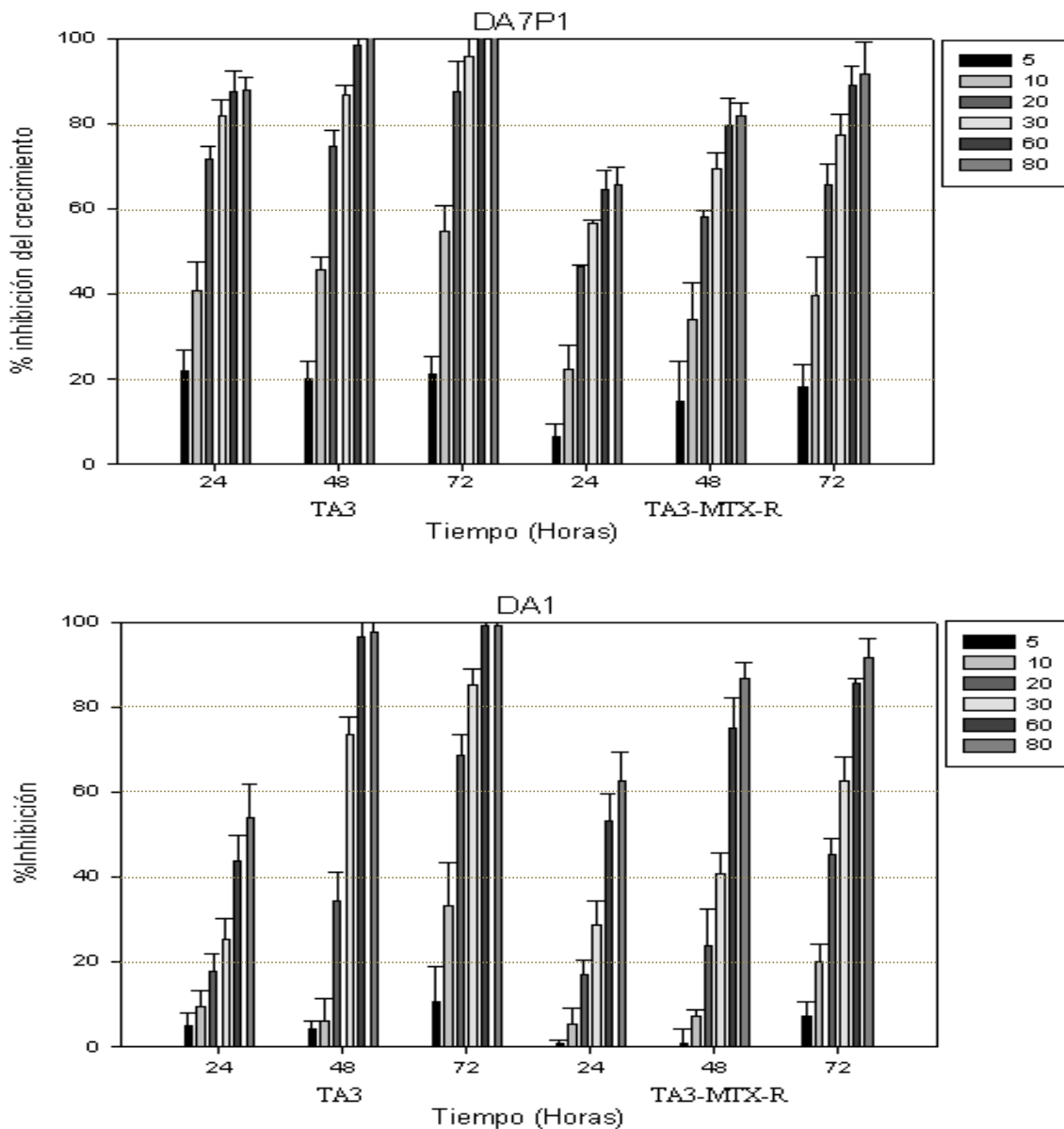


Figura 3.1a. Efecto de DA7P1 y DA1 sobre células de adenocarcinoma mamario de ratón de la línea celular TA3 y la sublínea resistente TA3-MTX-R. En el momento de agregar el compuesto la suspensión celular es de 200.000 células/ml aproximadamente. Las mediciones se realizaron luego de 24, 48, 72 hrs. de exposición al compuesto. Los resultados se expresan como % de inhibición del crecimiento respecto del control correspondiente. Cada resultado es el promedio de 3 o más experimentos realizados de forma independiente y por triplicado. Los IC₅₀ del compuesto DA7P1 a las 24 – 48 – 72 hrs. fueron 11.5 – 11.07 – 9.27 μM para TA3 y 22.6 – 15.6 – 13.1 para las TA3-MTX-R respectivamente. Los IC₅₀ del compuesto DA1 a las 24 – 48 – 72 hrs. fueron 71.8 – 23.4 – 13.95 μM para las TA3 y 54.4 – 36.1 – 22.4 para las TA3-MTX-R respectivamente.

Líneas celulares	TA3		TA3-MTX-R	
Compuestos	IC ₅₀ μM	SD μM	IC ₅₀ μM	SD μM
DA7P1	11,07	0,92	15,6	0,44
DA2P1	13,98	1,2	16,98	1,6
DA2P2	15,85	1,3	20,6	0,33
RAM7	16,71	0,75	32,6	2,34
RAM9	23,18	0,34	35,0	1,2
DA1	23,40	0,68	36,1	0,34

Tabla 3.1. Valores de los IC₅₀ alcanzados por los distintos compuestos sobre la línea celular TA3 y TA3-MTX-R a las 48 hrs. de exposición. Los resultados son el promedio ± SD de 3 o más experimentos realizados por triplicado.

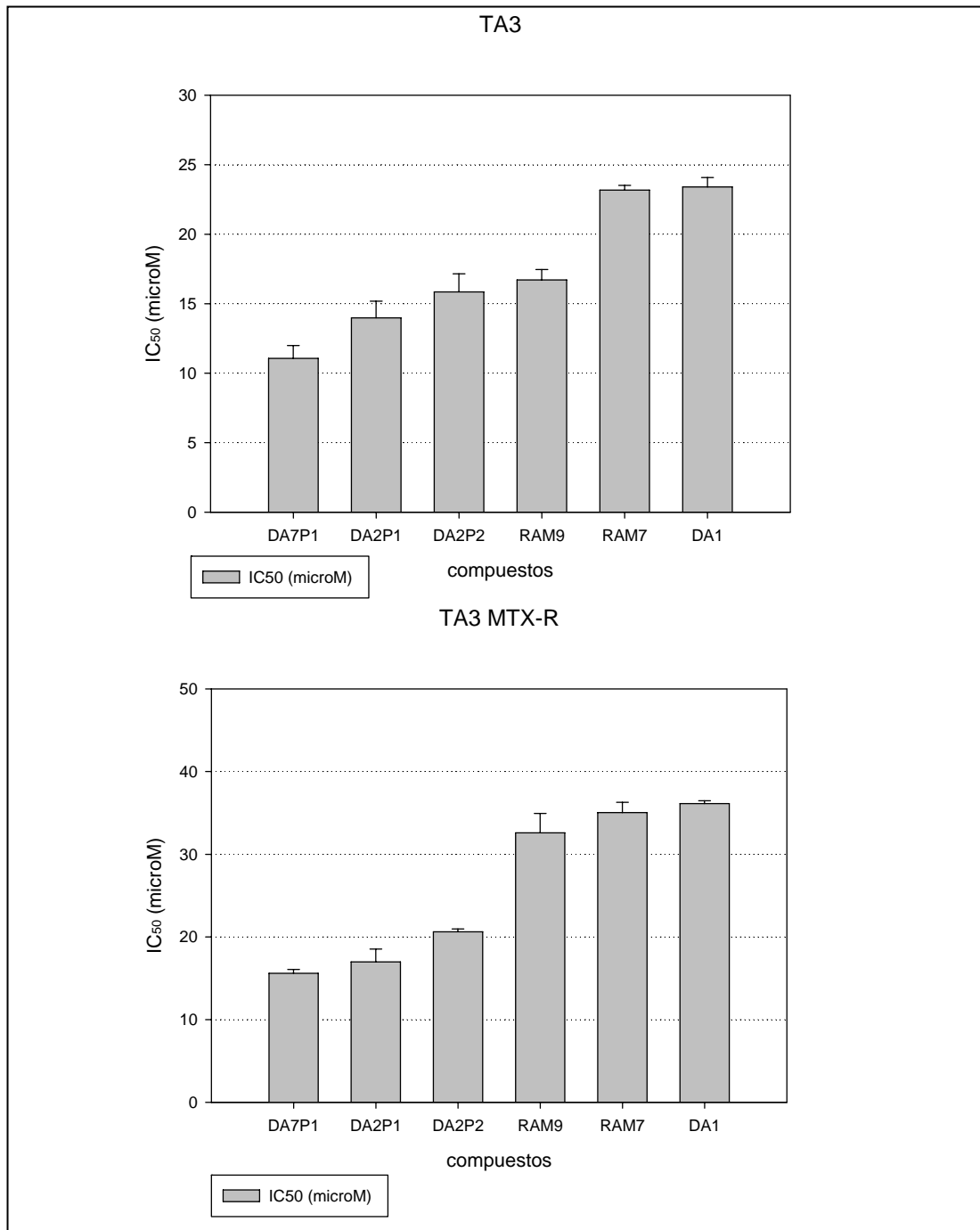


Grafico 3.1. Comparación de los IC₅₀ alcanzados por los compuestos en estudio sobre la línea celular TA3 y TA3-MTX-R a las 48 hrs. de exposición.

3.1.2 Efecto sobre el crecimiento de líneas celulares CCRF-CEM y variante resistente CEM/C2.

En los estudios de inhibición del crecimiento, los resultados están expresados como % de inhibición respecto del control. En la línea tumoral de linfocitos T CCRF-CEM y la sublínea resistente CEM/C2, se observó un incremento en las inhibiciones del crecimiento a medida que se aumentan las concentraciones de los distintos compuestos y el tiempo de exposición a estos. Los gráficos de inhibición de crecimiento a las 24, 48 y 72 se pueden ver en las figura 3.2a, 3.2b, 3.2c y en ellos se especifican los IC_{50} obtenidos a los distintos tiempos.

Para las comparaciones de actividades se utilizaron los IC_{50} luego de 48 hrs. de exposición a los compuestos. En la tabla 3.5 se muestran los valores de los IC_{50} , y en el gráfico 3.5 se comparan los IC_{50} entre ellos.

El compuesto más activo es el DA7P1, seguido por el DA2P1, con IC_{50} 9.24 – 12.4 μ M para CCRF-CEM y 10.6 – 13.6 μ M para CEM/C2 respectivamente. Los compuestos DA2P2, RAM9 y RAM7 obtuvieron actividades cercanas entre ellos, IC_{50} 14.0 – 14.4 – 18.9 μ M para la línea CCRF-CEM y 14.3 – 14.7 – 20.9 μ M para la sublínea CEM/C2 respectivamente. El compuesto DA1 es el menos activo dentro del conjunto probado alcanzando IC_{50} 29.7 μ M para las CCRF-CEM y 33.7 μ M para las CEM/C2.

El DA7P1, para ambos tipos celulares, posee una actividad aproximadamente 3 veces la del compuesto DA1, esto es alrededor de 200% mayor actividad que DA1, y aproximadamente el doble de la actividad de RAM9 correspondiente a un 100% aprox. de mayor actividad que RAM7, tanto para CCRF-CEM como para CEM/C2. Concerniente a los compuestos RAM9, DA2P2 y DA2P1, sobre células CCRF-CEM, el compuesto DA7P1 muestra una acción inhibitoria del crecimiento 52%, 44% y 34% mayor que estos. Sobre células CEM/C2 la actividad de DA7P1 es 59%, 36% y 28% mayor que aquella presente en los compuestos antes mencionados, respectivamente. Graf. 3.5, Los compuestos logran una inhibición mayor en CCRF-CEM que en la línea resistente CEM/C2, en general los IC_{50} alcanzados por los compuestos, en las horas 24-48-72, fueron superiores en la línea celular CCRF-CEM que en su variante resistente.

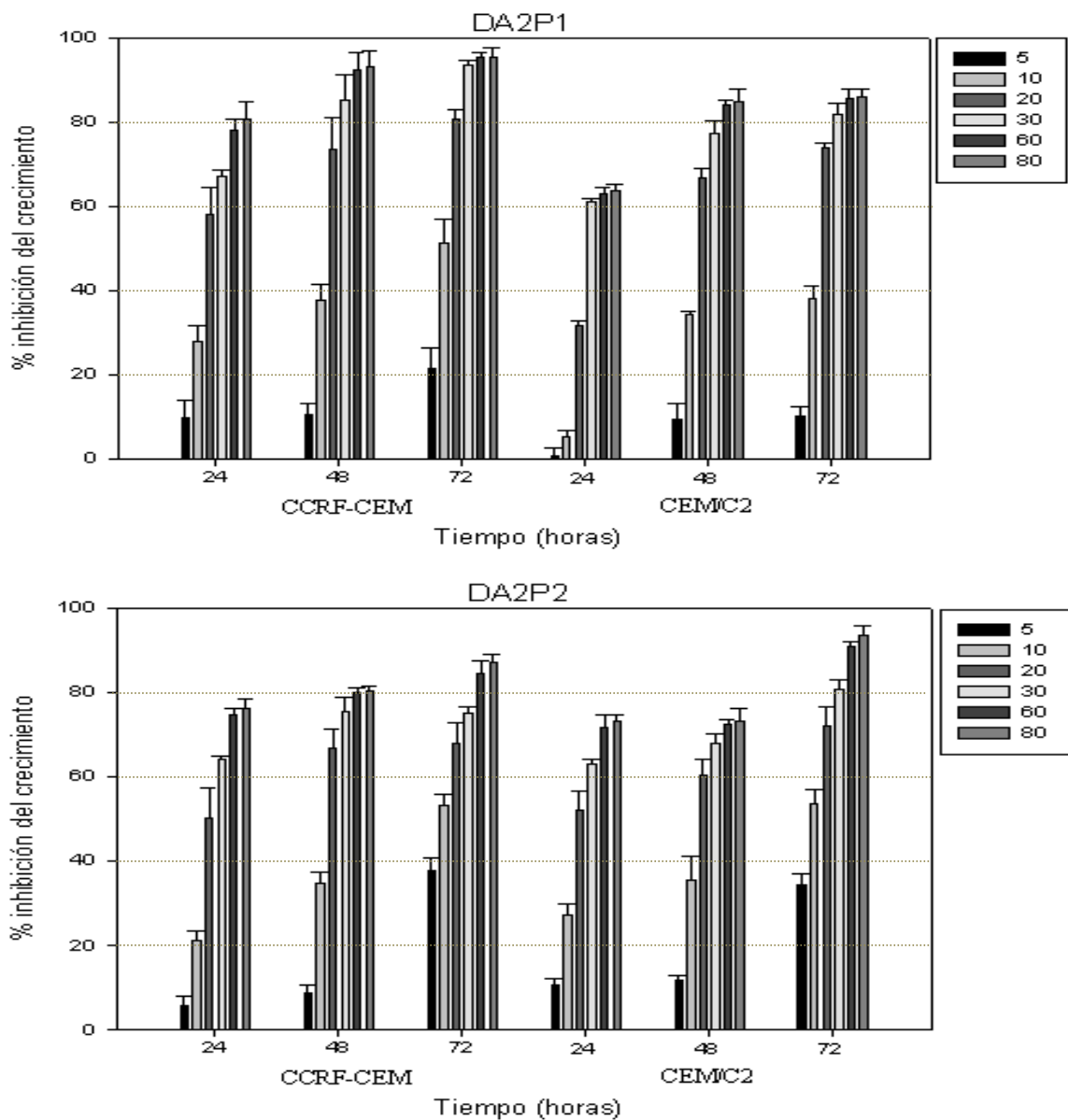


Figura 3.2a. Efecto de DA2P1 y DA2P2 sobre células tumorales de linfocitos T CCRF-CEM y la sublínea multiresistente CEM/C2. En el momento de agregar el compuesto la suspensión celular es de 200.000 células/ml aproximadamente. Las mediciones se realizaron luego de 24, 48, 72 hrs. de exposición al compuesto. Los resultados se expresan como % de inhibición del crecimiento respecto del control correspondiente. Cada resultado es el promedio de 3 o más experimentos realizados de forma independiente y por triplicado. Los IC_{50} del compuesto DA2P1 a las 24 – 48 – 72 hrs. fueron 16.8 – 12.5 – 9.54 μ M para las CCRF-CEM y 24.1 – 13.6 – 12.1 para las CEM/C2 respectivamente. Los IC_{50} del compuesto DA2P2 a las 24 – 48 – 72 hrs. fueron 19.9 – 13.3 – 8.64 μ M para CCRF-CEM y 22.6 – 14.4 – 8.82 para las CEM/CE2 respectivamente.

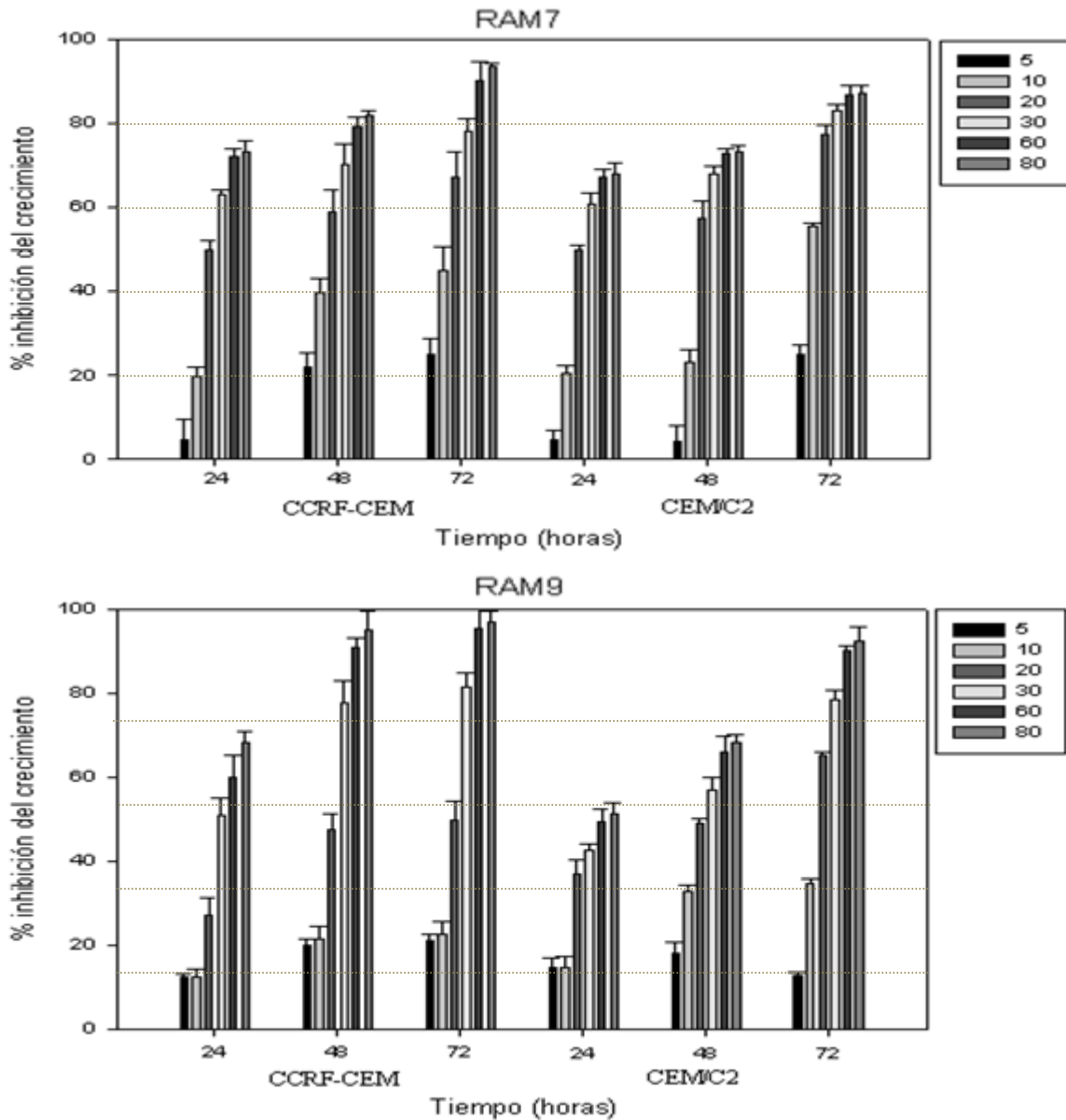


Figura 3.2b. Efecto de RAM7 y RAM9 sobre células tumorales de linfocitos T CCRF-CEM y la sublínea multiresistente CEM/C2. En el momento de agregar el compuesto la suspensión celular es de 200.000 células/ml aproximadamente. Las mediciones se realizaron luego de 24, 48, 72 hrs. de exposición al compuesto. Los resultados se expresan como % de inhibición del crecimiento respecto del control correspondiente. Cada resultado es el promedio de 3 o más experimentos realizados de forma independiente y por triplicado. Los IC_{50} del compuesto RAM7 a las 24 – 48 – 72 hrs. fueron 20.0 – 14.1 – 11.6 μ M para las CCRF-CEM y 20.2 – 16.9 – 8.84 para las CEM/C2 respectivamente. Los IC_{50} del compuesto RAM9 a las 24 – 48 – 72 hrs. fueron 36.3 – 18.9 – 17.4 μ M para CCRF-CEM y 64.6 – 20.9 – 20.3 para las CEM/CE2 respectivamente

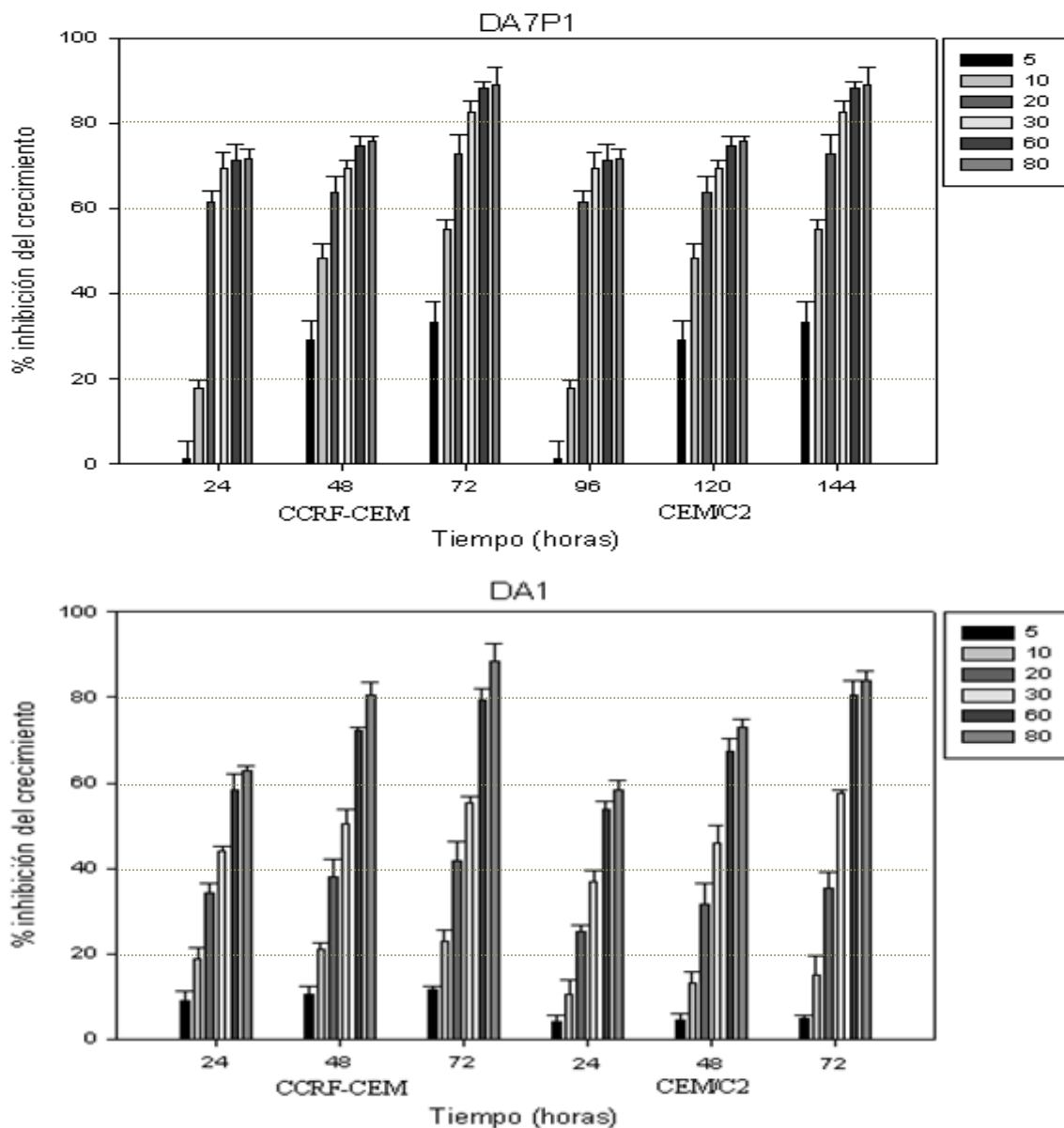


Figura 3.2c. Efecto de DA7P1 y DA1 sobre células tumorales de linfocitos T CCRF-CEM y la sublínea multiresistente CEM/C2. En el momento de agregar el compuesto la suspensión celular es de 200.000 células/ml aproximadamente. Las mediciones se realizaron luego de 24, 48, 72 hrs. de exposición al compuesto. Los resultados se expresan como % de inhibición del crecimiento respecto del control correspondiente. Cada resultado es el promedio de 3 o más experimentos realizados de forma independiente y por triplicado. Los IC_{50} del compuesto DA7P1 a las 24 – 48 – 72 hrs. fueron 14.98 – 9.24 – 8.88 μ M para CCRF-CEM y 15.8 -10.6 – 8.50 para las CEM/CE2 respectivamente. Los IC_{50} del compuesto DA1 a las 24 – 48 – 72 hrs. fueron 38.9 -29.7 – 25.7 μ M para las CCRF-CEM y 50.2 – 33.7 – 26.1 para las CEM/C2 respectivamente.

Líneas celulares	CCRF-CEM		CEM/C2	
	IC ₅₀ μM	SD μM	IC ₅₀ μM	SD μM
DA7P1	9,24	0,75	10,6	1,2
DA2P1	12,4	1,20	13,6	0,65
DA2P2	13,3	0,82	14,4	0,94
RAM7	14,1	0,67	16,9	0,61
RAM9	18,9	1,20	20,9	2,1
DA1	29,7	2,30	33,7	1,6

Tabla 3.2. Valores de los IC₅₀ alcanzados por los distintos compuestos sobre la línea celular CCRF-CEM y CEM/C2 a las 48 hrs. de exposición. Los resultados son el promedio ± SD de 3 o más experimentos realizados por triplicado.

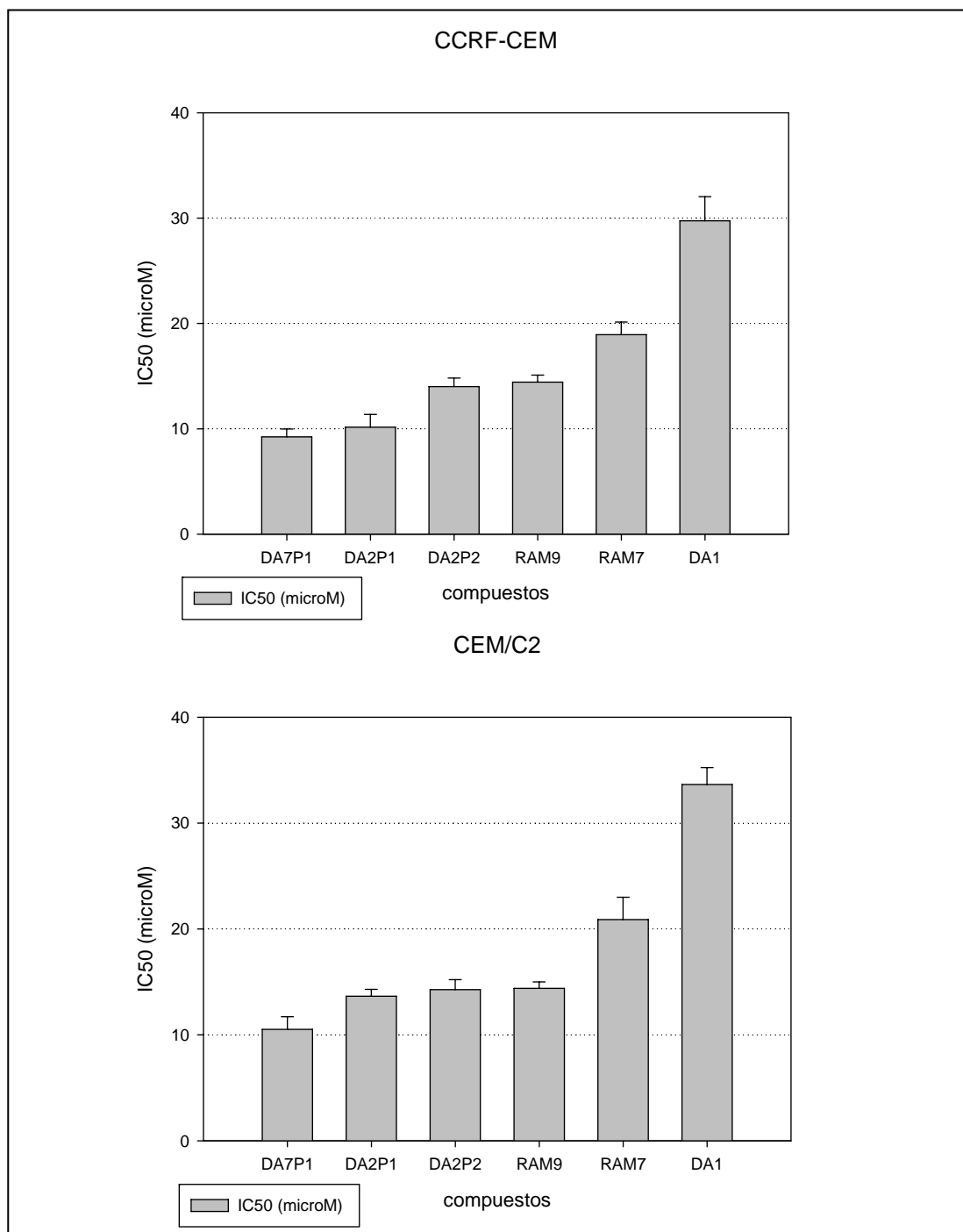


Grafico 3.2. Comparación de los IC₅₀ alcanzados por los compuestos en estudio sobre la línea celular TA3 y TA3-MTX-R a las 48 hrs. de exposición.

3.1.3 Efecto sobre el crecimiento de la línea celular VERO.

Los compuestos fueron probados en células no tumorales VERO (células epiteliales de riñón de mono verde africano *Chlorocebus*), en ellas al igual que en las líneas celulares anteriores se observó una inhibición del crecimiento progresiva a medida que se incrementaban las concentraciones de los compuestos y el tiempo al que eran expuestas. Una vez cumplidas las horas 24, 48 y 72 se obtuvieron las mediciones de inhibición de crecimiento respecto del control y se calcularon los IC₅₀, estos resultados pueden ser revisados en las figuras 3.3a, 3.3b, 3.3c.

Para las comparaciones entre las actividades de los compuestos se utilizaron las mediciones obtenidas a las 48 hrs. En la tabla 3.6 se presentan los valores de los IC₅₀ a las 48 hrs. de exposición a los compuestos en estudio y en el gráfico 3.6 se muestra una comparación de las actividades de estos.

DA7P1 es el compuesto que presenta mayor actividad alcanzando un IC₅₀ 11,7 µM, las actividades de DA2P1 y DA2P2 fueron similares, IC₅₀ 18,8 - 19,9 µM respectivamente, los compuestos RAM9, RAM7 alcanzaron los IC₅₀ 28.6 y 24.0 µM respectivamente, el compuesto DA1 es el que obtuvo la menor actividad con un IC₅₀ de 31,1 µM.

En el gráfico 3.6 se puede apreciar que el más potente de los compuestos probados es el compuesto DA7P1, este posee una actividad prácticamente 2,6 veces la del compuesto DA1, este último el menos potente de la serie, esto es alrededor de un 165% más potencia por parte de DA7P1. Concerniente al compuesto RAM7 y el compuesto RAM9, el DA7P1 posee una actividad que dobla la de estos compuestos, por lo tanto posee una actividad un 105% y 144% mayor que la observada en RAM7 y RAM9. La actividad de DA7P1 es 70% y 61% mayor que las de DA2P2 y DA2P1 respectivamente.

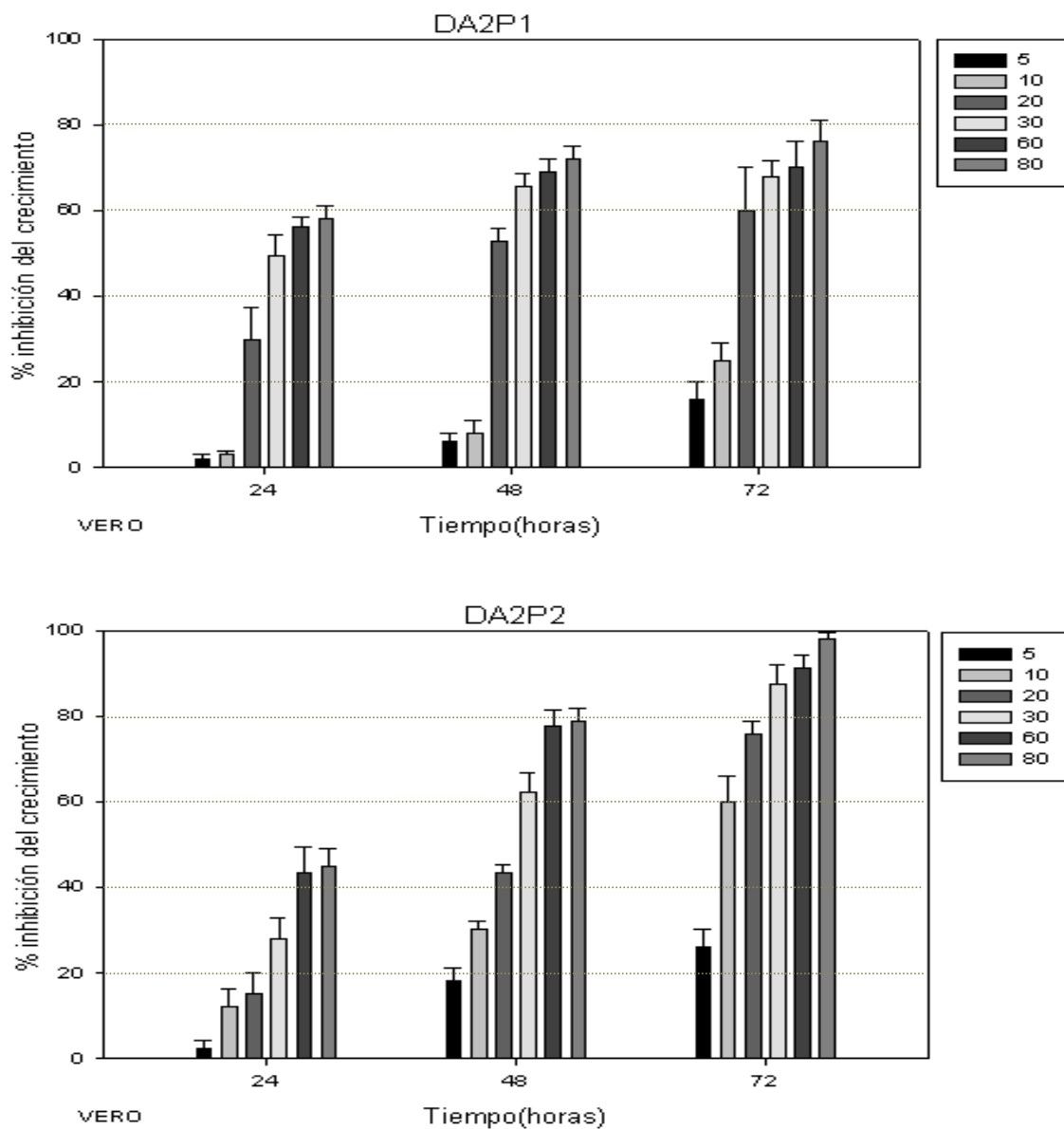


Figura 3.3a. Efecto de DA2P1 y DA2P2 sobre células no tumorales VERO. En el momento de agregar el compuesto la concentración celular es de 200.000 células/ml aproximadamente. Las mediciones se realizaron luego de 24, 48, 72 hrs. de exposición al compuesto. Los resultados se expresan como % de inhibición del crecimiento respecto del control correspondiente. Cada resultado es el promedio de 3 o más experimentos realizados de forma independiente y por triplicado. Los IC_{50} del compuesto DA2P1 a las 24 – 48 – 72 hrs. fueron 30.2 – 18.8 – 16.5 μM respectivamente. Los IC_{50} del compuesto DA2P2 a las 24 – 48 – 72 hrs. fueron 34.7 – 19.9 – 7.98 μM respectivamente.

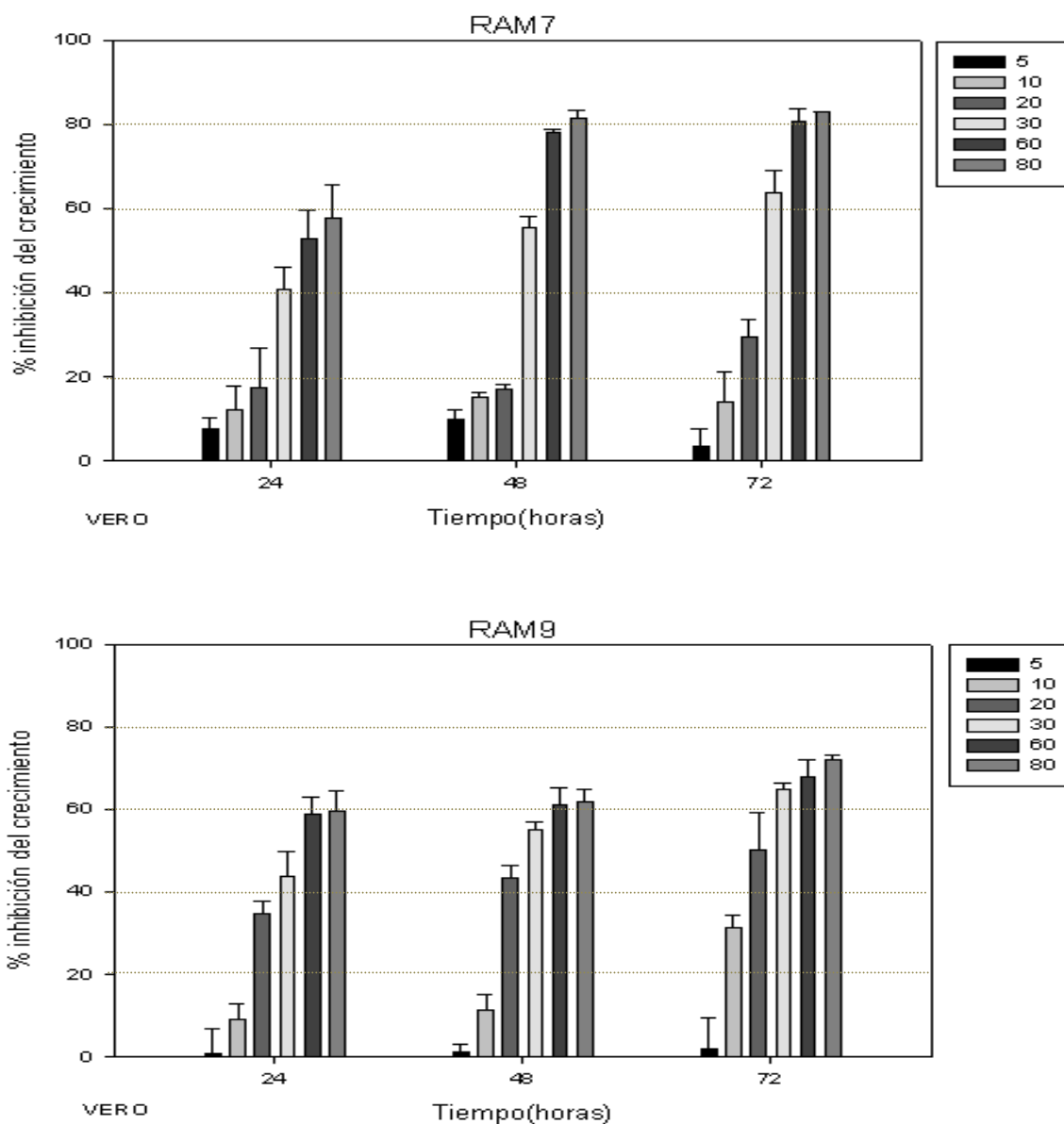


Figura 3.3b. Efecto de RAM7 y RAM9 sobre células no tumorales VERO. En el momento de agregar el compuesto la concentración celular es de 200.000 células/ml aproximadamente. Las mediciones se realizaron luego de 24, 48, 72 hrs. de exposición al compuesto. Los resultados se expresan como % de inhibición del crecimiento respecto del control correspondiente. Cada resultado es el promedio de 3 o más experimentos realizados de forma independiente y por triplicado. Los IC_{50} del compuesto RAM7 a las 24 – 48 – 72 hrs. fueron 44.6 – 24.0 – 17.8 μM respectivamente. Los IC_{50} del compuesto RAM9 a las 24 – 48 – 72 hrs. fueron 37.6 – 28.6 – 25.4 μM respectivamente.

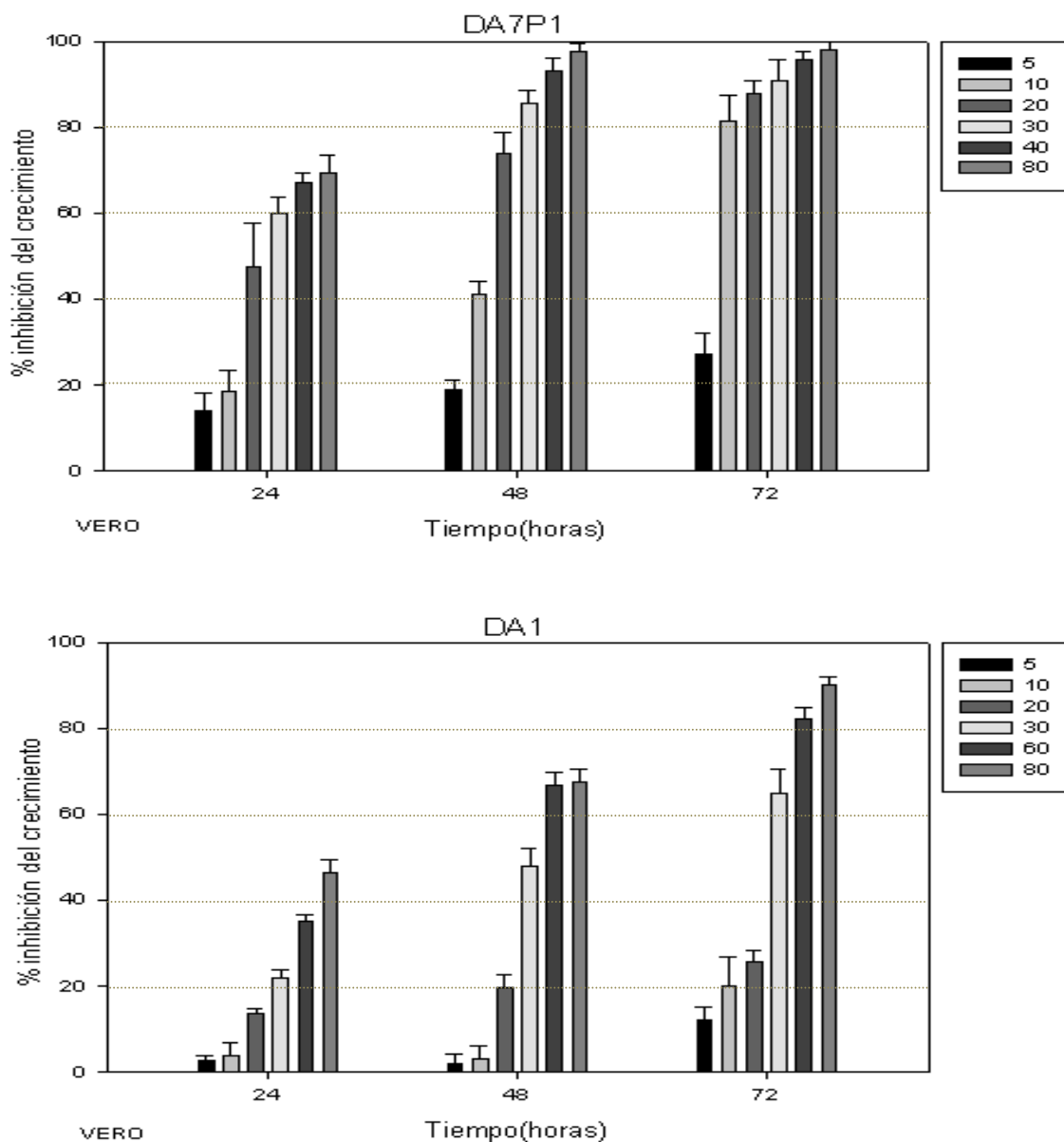


Figura 3.3c. Efecto de DA7P1 y DA1 sobre células no tumorales VERO. En el momento de agregar el compuesto la concentración celular es de 200.000 células/ml aproximadamente. Las mediciones se realizaron luego de 24, 48, 72 hrs. de exposición al compuesto. Los resultados se expresan como % de inhibición del crecimiento respecto del control correspondiente. Cada resultado es el promedio de 3 o más experimentos realizados de forma independiente y por triplicado. Los IC_{50} del compuesto DA7P1 a las 24 – 48 – 72 hrs. fueron 21.6 – 11.7 – 6.04 μ M respectivamente. Los IC_{50} del compuesto DA1 a las 24 – 48 – 72 hrs. fueron 92.0 – 31.1 – 26.1 μ M respectivamente.

Línea celular	VERO	
	IC ₅₀ μM	μM
DA7P1	11,7	0,30
DA2P1	18,8	0,20
DA2P2	19,5	0,31
RAM7	24,0	0,50
RAM9	28,6	0,31
DA1	31,1	0,64

Tabla 3.3. Valores de los IC₅₀ alcanzados por los distintos compuestos sobre la línea celular VERO a las 48 hrs. de exposición. Los resultados son el promedio ± SD de 3 o más experimentos realizados por triplicado.

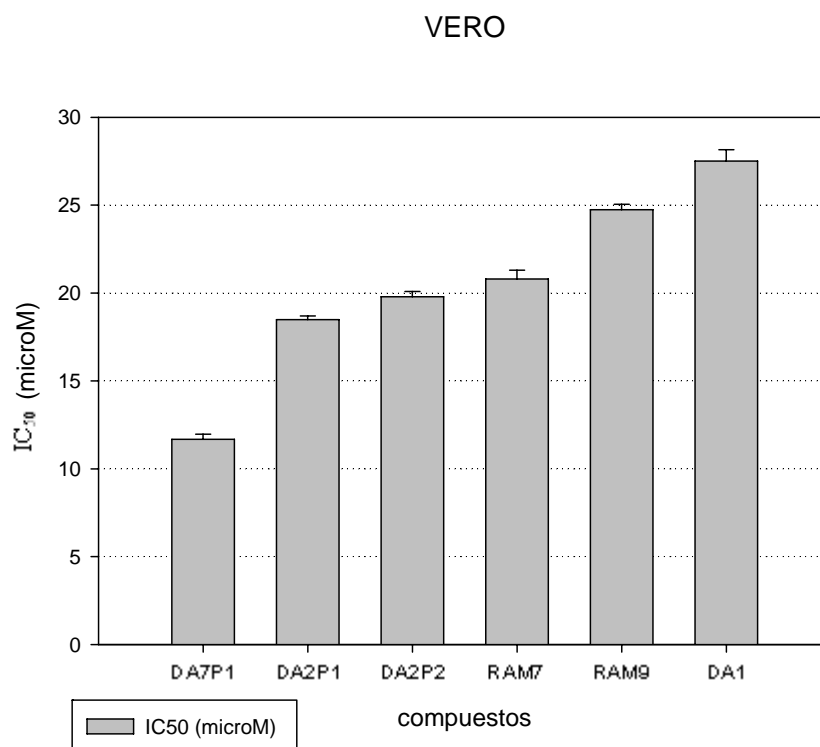


Grafico 3.3. Comparación de los IC₅₀ alcanzados por los compuestos en estudio sobre la línea celular VERO a las 48 hrs. de exposición.

3.2 Efecto de los compuestos en estudio sobre la respiración de células tumorales TA3 Y TA3-MTX-R.

En la figura 3.1 se muestran los trazos polarográficos característicos del consumo de oxígeno. En el primer trazo la actividad control representa una velocidad de consumo de oxígeno de 7,76 nmol O/min/mgr. prot.. El segundo trazo muestra la actividad del compuesto DA2P2 a una concentración baja, con la cual ocurre una activación del consumo de oxígeno de las células TA3, en este ensayo se observó una activación de la respiración en un 24% a una concentración de DA2P2 de 0.4 mM. Posteriormente, al aumentar en diez veces la concentración (4 mM), en la suspensión celular, el efecto desacoplante de la hidroquinona se solapa con la actividad inhibitoria, observándose un 29% de inhibición de la respiración. Finalmente en el último trazo se puede apreciar el efecto inhibitor de DA2P2 en presencia del desacoplador CCCP, en este ensayo se alcanza un 44% de inhibición a una concentración de 0.4 mM de.

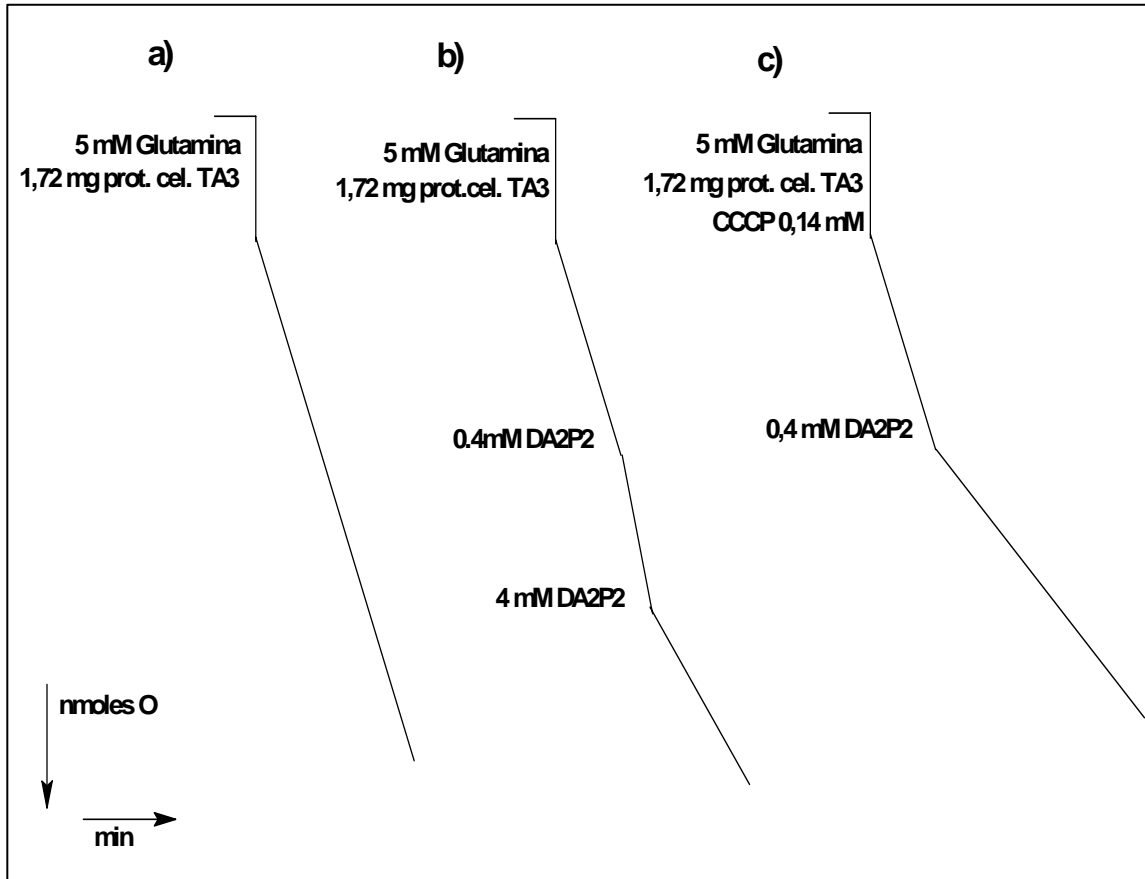


Figura 3.4 Trazos polarográficos que muestran: a) velocidad de consumo de oxígeno de la línea celular TA3, utilizando como sustrato glutamina. Representa la actividad control. b) Velocidad del consumo de oxígeno de la línea celular TA3 en presencia del compuesto hidroquinónico DA2P2, teniendo como sustrato glutamina. c) Velocidad del consumo de oxígeno de la línea celular TA3 en presencia del compuesto hidroquinónico DA2P2, teniendo como sustrato glutamina y como desacoplante el compuesto CCCP.

3.2.1 Efecto de los compuestos sobre la respiración de células tumorales TA3 Y TA3-MTX-R en ausencia de CCCP.

Se observó que en ausencia de CCCP las inhibiciones sobre la respiración celular, a concentraciones máximas alcanzadas antes de percibir precipitación en la cámara del polarógrafo, no superaron el 50% respecto del control. Además se observó que en un rango de concentración (0 - 0,4 mM), los compuestos estudiados actuaban como activadores de la respiración.

En el gráfico 3.2 y la tabla 3.2 se muestran las actividades comprendidas en el rango de concentración de los compuestos entre 0 – 0,4 mM y en ausencia del desacoplador CCCP. En estas condiciones los compuestos se comportan como activadores de la respiración celular. Aquel compuesto que generó una mayor activación fue el DA2P1 alcanzando un 31% de activación en la línea TA3 y 30,7 % en la línea TA3-MTX-R. Los compuestos DA2P2 y DA7P1 obtuvieron 25,1 – 24,1 % de activación en la línea TA3 y 27,5 – 23,8 % de activación en la línea TA3-MTX-R. El compuesto que generó una menor activación en ambas líneas celulares es el DA1, 21,1 % sobre TA3 y 13,4% sobre TA3-MTX-R. Los compuestos presentaron activaciones muy similares ante las dos líneas, la excepción la hace el compuesto DA1 el cual disminuye la activación sobre TA3-MTX-R en un 56.9% respecto de la generada sobre las células TA3.

En el gráfico 3.2 y la tabla 3.2 también se muestran los resultados de inhibición de la respiración en presencia de CCCP. Estos resultados fueron obtenidos a rangos de concentraciones mayores a aquellas en las cuales se observaron los efectos activadores detallados anteriormente. No se pudieron realizar comparaciones entre IC_{50} debido a que en ausencia de CCCP no se obtuvieron inhibiciones mayores al 50%. Sin embargo se hace una comparación de las inhibiciones máximas respectivas de cada compuesto con lo que se pueden visualizar diferencias entre la eficacia de los compuestos en relación a la inhibición de la respiración celular. La eficacia está dada por la máxima respuesta generada por un compuesto sobre su diana, y esta depende del número de complejos formados y de la eficiencia del receptor involucrado.

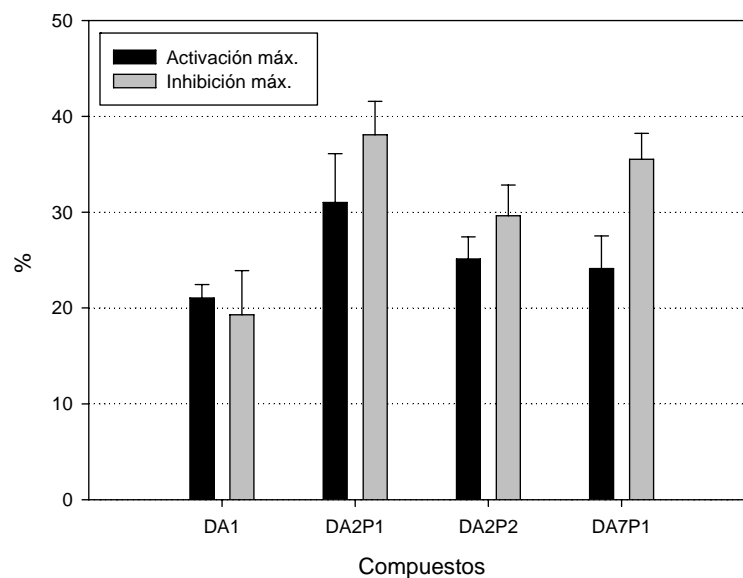
Aquellos compuestos que alcanzaron una mayor inhibición máxima son, en orden descendente, DA2P1 y DA7P1, 38.1 y 35.5% de inhibición máxima sobre TA3. En el caso de los resultados obtenidos sobre la línea TA3-MTX-R, el que generó la inhibición máxima mayor es el DA7P1 seguido del DA2P1, 36.1 y 34% respectivamente. DA2P2 obtuvo 29,6% de inhibición sobre TA3 y 28,9% sobre TA3-MTX-R. Al comparar las inhibiciones sobre las dos líneas celulares se puede apreciar que las inhibiciones son menores sobre la línea resistente, en el caso de DA2P1 y DA2P2, o prácticamente iguales como es el caso de DA7P1, mientras tanto, en relación con el compuesto DA1 se ve un aumento de la inhibición sobre la sublínea resistente, es decir un incremento del 27.7% respecto de la inhibición sobre TA3.

La propiedad de activar la respiración celular es propia del comportamiento de ácido débil que tienen los grupos hidróxilos en el anillo aromático.

línea celular	TA3			TA3-MTX-R		
	% Activación máx.(0-0,4mM)	mM	% Inhibición máx.	% Activación máx.(0-0,4mM)	mM	% Inhibición máx.
DA1	21,1	5	19,3	13,4	5	26,7
DA2P1	31,0	4	38,1	30,7	4	36,1
DA2P2	25,1	4	29,6	27,5	4	28,9
DA7P1	24,1	0,3	35,5	23,8	0,3	34,0

Tabla 3.4. Valores de los efectos máximos alcanzados por los compuestos sobre las líneas TA3 y TA3-MTX-R. Los valores están expresados como % respecto de la actividad control. Los experimentos se realizaron en ausencia del desacoplante CCCP. Los resultados de activación máxima ocurrieron en el rango de concentración 0-0,4mM. Los resultados son el promedio de tres o más experimentos independientes para cada compuesto en estudio.

Comparación de % de Activaciones e Inhibiciones Máximas en Células TA3



Comparación de % de Activaciones e Inhibiciones Máximas en Células TA3 - MTX -R

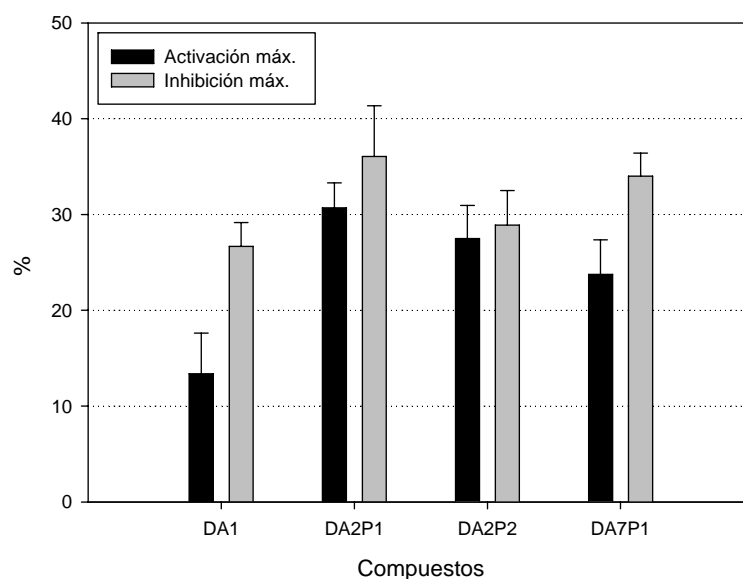


Gráfico 3.4. Efectos máximos de los compuestos en estudio sobre las líneas celulares TA3 Y TA3-MTX-R expresados como % de activación y % de inhibición respecto de la actividad control, en ausencia de CCCP. Resultados promedios de tres o más experimentos independientes para cada compuesto en estudio.

3.2.2 Efecto de los compuestos sobre la respiración de células tumorales TA3 Y TA3-MTX-R en presencia de CCCP.

Como anteriormente se desarrolló el caso de inhibición respiratoria en ausencia de CCCP, en el cual se observó una inhibición celular con una acción activadora solapada. Ahora se muestran los resultados de inhibición celular en presencia de CCCP, con el objeto de expresar solamente la actividad inhibitoria de los compuestos sobre las líneas de carcinoma mamario de ratón.

En el gráfico 3.1 y la tabla 3.1 se comparan las inhibiciones máximas de la respiración celular provocadas por los compuestos estudiados en presencia del desacoplante CCCP. Los compuestos DA2P1 Y DA7P1 presentan una inhibición máxima de 85,3 % a 83,98 % para la línea celular TA3 y de 84,7 % a 78,2 % para la línea celular TA3-MTX-R a las concentraciones 4 mM y 0,3 mM respectivamente. Para los compuestos RAM7 y RAM9 las inhibiciones máximas fueron similares entre ellos, 77,0 % - 75,6 % para la línea celular TA3 y 71,2 % - 72,8 % para la línea celular TA3-MTX-R respectivamente a la concentración 1 mM. El compuesto DA2P2 alcanzó un efecto máximo de 67,8 % para la línea TA3 y 66,3 % para la línea TA3-MTX-R a la concentración 4 mM y el compuesto DA1 obtuvo los efectos máximos 72,7 % - 53,0 % para las líneas TA3 y TA3-MTX-R a la concentración 5 mM.

Como se puede apreciar en el gráfico 3.1 el compuesto que alcanzó una mayor actividad máxima sobre la línea celular TA3 es el DA7P1 y seguidamente el DA2P1. Aquel compuesto con menor actividad sobre esta línea celular es el DA2P2. Las actividades máximas de los compuestos sobre la sublínea resistente fueron en general menores respecto de los resultados obtenidos sobre las células TA3, sin embargo el DA2P1 y el DA2P2 mantuvieron prácticamente la misma inhibición máxima en las dos líneas, y el primero encabeza la actividad máxima sobre la línea resistente quedando el DA7P1 como el segundo compuesto con mayor actividad. El compuesto con menor actividad sobre TA3-MTX-R es el DA1, este compuesto sufrió una disminución de la inhibición máxima de aproximadamente el 70% sobre TA3-MTX-R respecto de la alcanzada sobre la línea TA3.

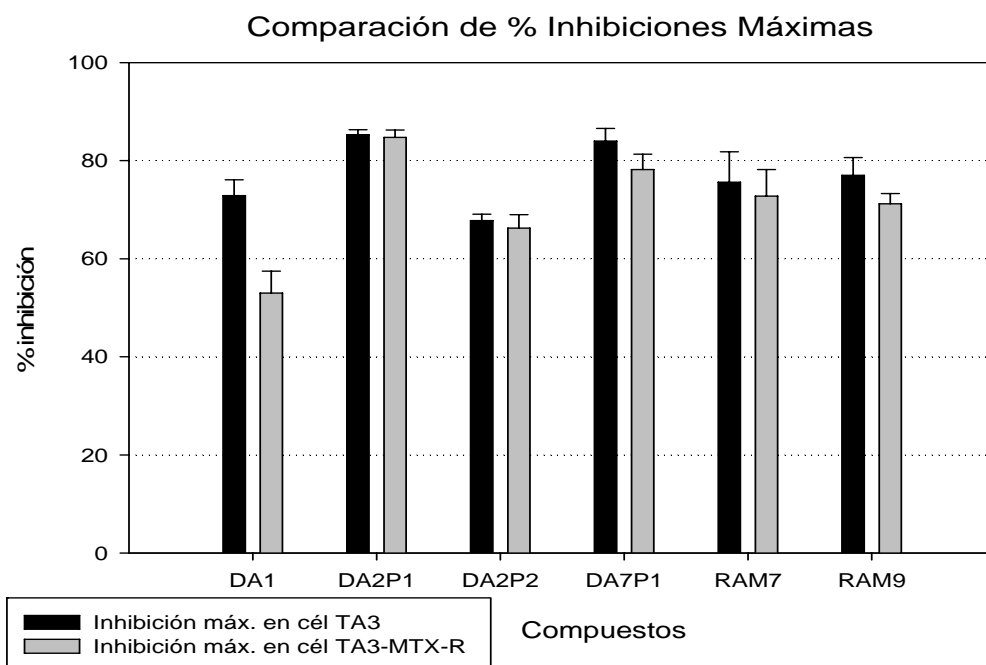


Gráfico 3.5. Comparación de las inhibiciones máximas, alcanzadas por los compuestos en estudio sobre las líneas celulares TA3 Y TA3-MTX-R, en presencia de CCCP. Los resultados se encuentran expresados en % de inhibición respecto de la actividad control. Los resultados finales fueron obtenidos de tres o más experimentos independientes.

Línea celular	TA3		TA3-MTX-R	
	mM	% Inhibición mx.	mM	% Inhibición mx.
DA1	5	72,7 ± 3.2	5	53,0 ± 4.5
DA2P1	4	85,3 ± 1.02	4	84,7 ± 1.5
DA2P2	4	67,8 ± 1.3	4	66,3 ± 2.7
DA7P1	0,3	83,98 ± 2.6	0,3	78,2 ± 3.1
RAM7	1	75,6 ± 6.2	1	72,8 ± 5.4
RAM9	1	77,0 ± 3.6	1	71,2 ± 2.1

Tabla 3.5. Valores de inhibición máxima de cada compuesto sobre las líneas celulares TA3 Y TA3-MTX-R, en presencia de CCCP. Los valores son expresados en % de inhibición respecto a la actividad control. Los resultados finales fueron obtenidos de tres o más experimentos independientes.

Las inhibiciones sobre la respiración celular mostrada por los compuestos en presencia de CCCP, como se detalló anteriormente, superaron el 50% de inhibición, a diferencia de lo observado en ausencia de CCCP. Por lo mismo es posible realizar una comparación de las potencias de los compuestos expresadas por los IC_{50} respectivos.

En el gráfico 3.3 y la tabla 3.3 se pueden observar los IC_{50} correspondiente a la inhibición de la respiración sobre las líneas TA3 y TA3-MTX-R en presencia del desacoplador CCCP. El compuesto DA7P1 es el que presenta el mayor efecto sobre la respiración dentro del arsenal estudiado tanto en la línea celular TA3 como sobre TA3-MTX-R, sus IC_{50} son de 0.012 mM y 0.035 mM respectivamente, mientras que el de menor actividad es el compuesto DA1 con un IC_{50} 1,57 mM para TA3 y 3.08 para TA3-MTX-R. Los IC_{50} intermedios son: sobre las líneas TA3, 0.043, 0.085, 0.109, 0.545 para los compuestos RAM7, DA2P1, RAM9, DA2P2 y sobre las líneas TA3-MTX-R los IC_{50} obtenidos son 0.091, 0.186, 0.296, 1.226 para RAM7, DA2P1, RAM9, DA2P2 respectivamente.

Se puede observar que, sobre las dos líneas celulares, DA7P1 mostró ser más eficaz al inhibir la respiración, presentó un efecto sobre TA3 130 veces mayor que el compuesto DA1 y 88 veces mayor respecto a la acción de DA1 sobre TA3-MTX-R. Comparado con DA2P2 es aproximadamente 40 veces más efectivo sobre ambas líneas. Respecto de los compuestos RAM9, DA2P1 y RAM7 el compuesto DA7P1 posee un efecto sobre la respiración aproximadamente 9, 7 y 3 veces mayor que estos correspondientemente.

En general se necesitó una mayor concentración de los compuestos para inhibir el 50% de la respiración sobre las células TA3-MTX-R que sobre las células TA3. Las curvas de inhibición son de tipo sigmoidea lo que indica un efecto cooperativo.

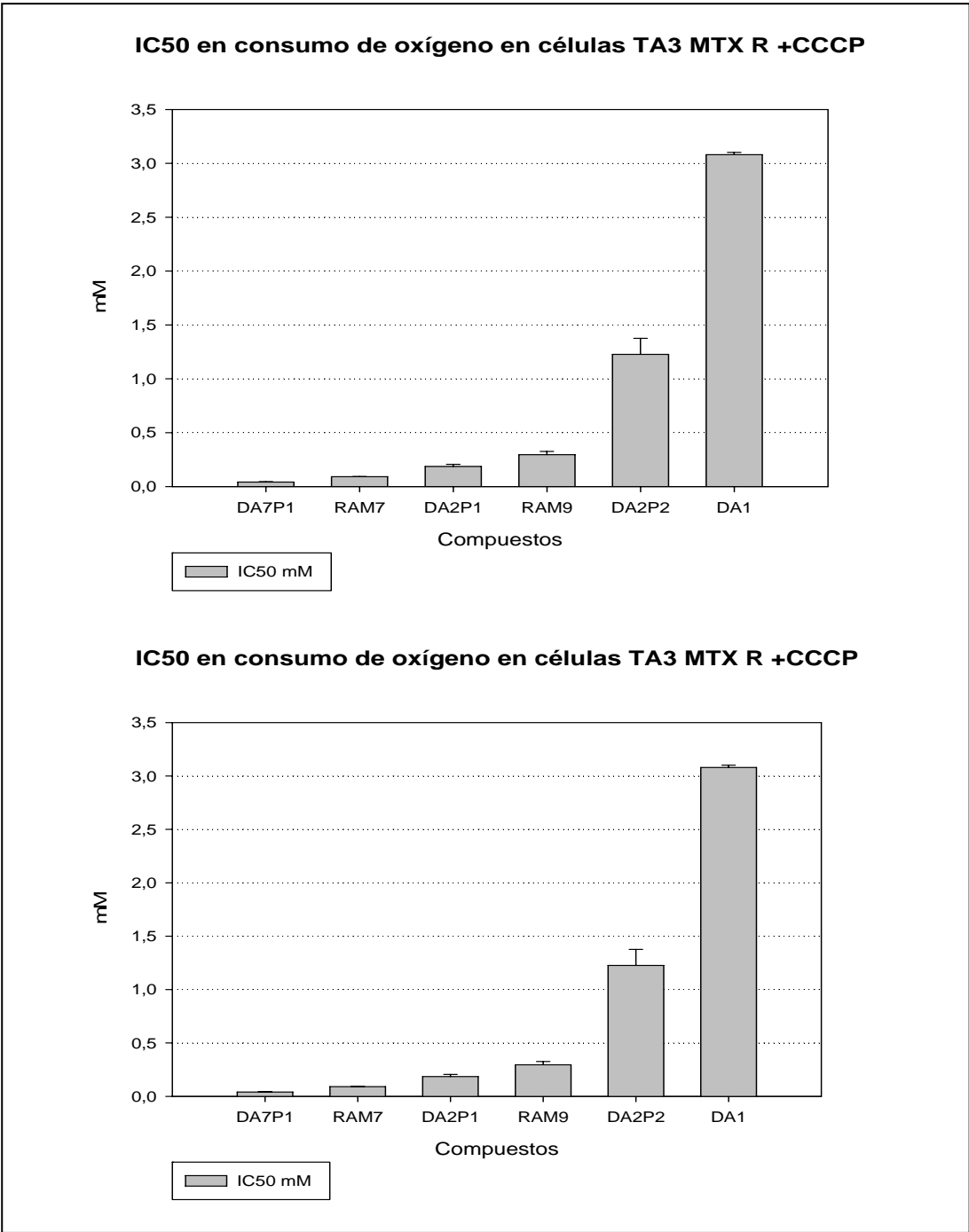


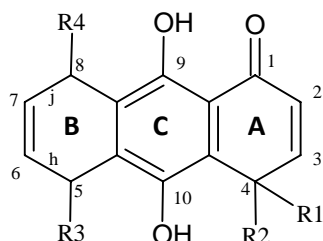
Gráfico 3.6. Comparación de los valores IC₅₀ para cada compuesto sobre las líneas TA3 y TA3-MTX-R , en presencia de CCCP.

Línea celular	TA3		TA3-MTX-R	
	IC ₅₀ mM	SD mM	IC ₅₀ mM	SD mM
DA7P1	0,012	0,002	0,035	0,003
RAM7	0,043	0,002	0,091	0,002
DA2P1	0,085	0,002	0,186	0,020
RAM9	0,109	0,032	0,296	0,002
DA2P2	0,545	0,021	1,226	0,150
DA1	1,57	0,022	3,08	0,021

Tabla 3.6. Efecto de los compuestos en estudio sobre la respiración celular en presencia de CCCP.

IC50: Corresponde a la concentración necesaria de un compuesto determinado para inhibir la respiración en un 50%.

Discusión



Compuesto	R1	R2	R3	R4	<i>h</i>	<i>i</i>
DA2P1	CH ₃	CH ₃	CH ₂ OH	H	H	*C ₆ H ₁₂
DA2P2	CH ₃	CH ₃	H	CH ₂ OH	*C ₆ H ₁₂	H
DA7P1	CH ₂ CH ₃	CH ₂ CH ₃	CH ₂ OH	H	H	*C ₆ H ₁₂
DA1	CH ₃	CH ₃	CH ₂ OC OCH ₃	H	H	*C ₆ H ₁₂
RAM9	CH ₃	CH ₃	CH ₃	CH ₂ OH	H	H
RAM7	CH ₃	CH ₃	CH ₂ OH	CH ₃	H	H

* C₆H₁₂: ciclohexano fusionado al anillo antracénico en su cara "h" o "j".

DA2P1 ^{v/s} DA7P1:

Estructuralmente los compuestos DA2P1 y DA7P1 confluyen en sus sustituyentes: poseen un ciclohexano fusionado a la cara j del anillo antracénico y un alcohol metílico sobre el C5. Divergen en los sustituyentes R1 y R2, ambos metilos en el compuesto DA2P1 y etilos en el compuesto DA7P1. Esta variación hace que este último sea levemente más lipofílico, esto ayudaría hipotéticamente a la difusión a través de las barreras lipídicas y por lo tanto facilita la interacción ligando-receptor.

Al alargar las cadenas alquílicas sobre el carbono 4 se ve una disminución de la efectividad aunque de forma mínima, los efectos máximos alcanzados sobre la respiración celular por estos compuestos fueron cercanos al 80%. El compuesto DA2P1 posee una efectividad mayor aunque con diferencia escasa respecto a DA7P1. En presencia de CCCP es 1,5%_(TA3) y 7,7%_(TA3-MTX-R) más efectivo que DA7P1, en ausencia de CCCP es 6,8%_(TA3) y 5,8%_(TA3-MTX-R) más efectivo que DA7P1. También se ve que el compuesto con etilos tiene un acción activadora disminuida,

presentando una activación máxima 22,2%_(TA3) y 22,5%_(TA3-MTX-R) menor que DA2P1 (TA3: 24,1%_(DA7P1) ^V/_S31%_(DA2P1)act.máx. y TA3-MTX-R: 23,8%_(DA7P1) ^V/_S30,7%_(DA2P1) act.máx). No obstante aunque DA2P1, con sustituyentes metálicos R1 y R2, muestra una superioridad en efectividad frente a la inhibición de la respiración tanto como en la capacidad desacoplante, el reemplazo por sustituyentes etílicos, ocurrido en el compuesto DA7P1, permite mayor potencia en la inhibición de la respiración siendo 85,9% más potente sobre células TA3 y 81,2% más potente sobre células TA3-MTX-R que DA2P1 (DA7P1 tiene 7,08_(TA3) y 5,31_(TA3-MTX-R) veces mayor potencia que DA2P1).

Las mediciones de viabilidad realizadas sobre diversas células mostraron que el compuesto DA7P1 es aquel con más actividad de la serie, es por tanto más potente sobre la inhibición del crecimiento celular que DA2P1. DA7P1 tiene una actividad 20,81% y 8,13% mayor que la obtenida por DA2P1 sobre células TA3 y su variante resistente respectivamente. Frente a células CCRF-CEM y CEM/C2 el compuesto DA7P1 tiene una actividad 25,5% y 22,05% mayor que la obtenida por el compuesto DA2P1. Por último, las pruebas de viabilidad obtenidas sobre las células Vero muestran que DA7P1 es 37,8% más potente que DA2P1. Los datos obtenidos demuestran que el compuesto con etilos posee mayor potencia que aquel que posee metilos como sustituyentes R1 y R2, siendo mayor esta diferencia en potencia sobre células epiteliales de riñón de mono verde africano (VERO). (DA7P1 es: 1,26_(TA3), 1,09_(TA3-MTX-R), 1,34_(CCRF-CEM), 1,28_(CEM/C2) y 1,6_(VERO) veces la potencia de DA2P1).

El compuesto DA7P1 muestra una disminución de 29% en la actividad sobre la línea resistente de tumor mamario de ratón (TA3-MTX-R) respecto de la sensible (TA3). En cuanto a las células tumorales de linfocitos T (CCRF-/CEM) disminuye su potencia en un 12,8% en comparación con la actividad sobre la variante resistente (CEM/C2). En cuanto a DA2P1, este presenta un 21,4% de menor actividad sobre TA3 que sobre TA3-MTX-R y un 8,82% de menor actividad sobre CEM/C2 que sobre CCRF-CEM. Por lo tanto se tiene que Ambos compuestos disminuyen su potencia sobre las sublíneas resistentes, siendo menor esta diferencia en la línea de tumor de linfocito T, para ambos compuestos.

En comparación con lo observado sobre células TA3 y células Vero, se tiene que el compuesto DA7P1 presenta una diferencia mínima en sus actividades, 5,38% más potencia sobre TA3 que aquella observada sobre VERO, sin embargo, es más interesante lo observado en

células CCRF-CEM ante la cual la actividad de DA7P1 es un 21,03% mayor que sobre células VERO. En el compuesto DA2P1 se observa una mayor selectividad inhibitoria sobre las líneas tumorales que aquella mostrada por el compuesto DA7P1, anteriormente. Las actividades sobre células VERO son menores en un 25,6% que sobre TA3 y en un 34,04% respecto a células CCRF-CEM. Por lo tanto tenemos que se detectan diferencias entre las actividades sobre células tumorales y normales y se deduce que el compuesto DA2P1 es más selectivo que el compuesto DA7P1 entre células tumorales y normales. (DA2P1:La potencia sobre VERO es menor en un 25,6%_(TA3) y 34,04%_(CCRF-CEM)).

DA2P1 \forall DA1:

En el compuesto DA1 existe una modificación en el sustituyente R3 respecto del compuesto DA2P1, sobre el C5 se ha realizado una esterificación, eliminando de esta forma el sustituyente R3= -CH₂OH y dejando en su lugar una función R3 = -CH₂OC OCH₃, el resto de la estructura es compartida con DA2P1. Al comparar estas dos moléculas se puede referir que esta aumentada la lipofilia de DA1 respecto de DA2P1.

Los resultados de los experimentos sobre inhibición de la respiración celular muestran que la esterificación en C5 disminuye la efectividad de DA1, tanto en la inhibición como la activación de la respiración celular, respecto de aquella observada por DA2P1. Sobre la inhibición de la respiración la efectividad baja en 14,8%_(TA3) y 37,4%_(TA3-MTX-R) en presencia de CCCP y se observa una atenuación de 49%_(TA3) y 21%_(TA3-MTX-R) en ausencia de CCCP respecto de DA2P1. La activación máxima de la respiración causada por DA1 también se ve disminuida respecto de aquella observada en DA2P1, la activación máxima de DA1 es 31,9%_(TA3) y 56,4%_(TA3-MTX-R) menor que la presentada por DA2P1. Los resultados sobre la respiración celular anteriormente revisados muestran que al eliminar el sustituyente alcohol metílico y reemplazarlo por el sustituyente R3= -CH₂OCOCH₃ se genera una disminución importante sobre la efectividad tanto en inhibición como activación de la respiración. Ahora bien, en cuanto a potencia sobre la inhibición de la respiración en células tumorales TA3 y TA3-MTX-R, DA2P1 tiene una potencia 1747% y 1555% veces mayor que la mostrada por DA1 (DA2P1 tiene 18,5_(TA3) y 16,6_(TA3-MTX-R) veces más potencia que DA1). DA1 es el compuesto de menor potencia sobre la inhibición

de la respiración celular de la serie, mostrando particularmente una actividad muy disminuida en la inhibición de la respiración respecto de aquella observada por DA2P1.

Los resultados de viabilidad celular obtenidos no distan demasiado de la senda antes mencionada, el compuesto DA1 demostró ser el menos potente, en todas las líneas celulares, de los seis compuestos probados. DA2P1 tiene una potencia 67,4%_(TA3) y 112,6%_(TA3-MTX-R) mayor que la observada en DA1, sobre la línea tumoral de linfocitos T DA2P1 es 139,5%_(CCRF-CEM) y 147,8%_(CEM/C2) más potente que DA1 y sobre la línea VERO se obtuvo que DA2P1 es 65,4% más potente que DA1. (DA2P1 es: 1,67_(TA3), 2,13_(TA3-MTX-R), 2,4_(CCRF-CEM), 2,48_(CEM/C2) y 1,65_(VERO) veces la pot. de DA1)

Respecto de las actividades mostradas por DA1 ante las células sensibles y sus variantes resistentes tenemos que: es menos activo en un 35% sobre TA3-MTX-R comparado con TA3 y menos activo en un 11,9% sobre CEM/C2 que sobre CCRF-CE. (DA2P1: 21,4% y 8,82% respectivamente). DA1 es menos activo sobre las variantes resistentes.

El compuesto DA1 muestra una apreciable disminución de actividad sobre células VERO en las cuales inhibe un 24,8% menos que sobre las células tumorales TA3, en cuanto a las células CCRF-CEM esta diferencia es menor, se observa una actividad sobre células VERO 4,5% menor que sobre CCRF-CEM. Se puede apreciar que hay una mayor potencia en las actividades sobre células tumorales mamarias que sobre las normales, pero que esta selectividad es ínfima entre células VERO y células tumorales de linfocitos T. (DA2P1: 34,5%_(TA3) y 25,6%_(CCRF-CEM) menos potencia en VERO)

DA2P1 ^v/_s RAM7:

En el compuesto RAM7, a diferencia de DA2P1, el anillo B se encuentra desprovisto del ciclohexano sobre su cara j, a cambio de este anillo alquilico se encuentra un sustituyente metilo sobre el C8, el resto de los sustituyentes los comparte con DA2P1. Además de estar desprovisto del volumen del ciclohexano adyacente al -OH sobre el C9 esta variación hace que RAM7 sea menos lipofílico que DA2P1 a diferencia de los compuestos revisados anteriormente, DA7P1 y DA1, en los cuales la lipofelicidad se encuentra aumentada. En consecuencia de esta variación RAM7 disminuyó su efectividad en un 11,4%_(TA3) y 14,05%_(TA3-MTX-R) respecto de DA2P1. Los

resultados de inhibición de la respiración celular muestran que el desempeño de RAM7 como inhibidor se incrementa, tanto para TA3 como para su variante resistente, un 49,4% y 51,1% respectivamente (RAM7 tiene 1,98_(TA3) y 2,04_(TA3-MTX-R) veces la pot. DA2P1). Tenemos entonces que aún cuando la efectividad ante la inhibición de la respiración se ve disminuida respecto del compuesto DA2P1, los resultados de IC₅₀ muestran que la potencia sobre la inhibición de la respiración se ven afectadas de forma positiva debido a la ausencia del ciclohexano fusionado a la cara *j*.

Los resultados de viabilidad nos indican un descenso en las actividades del compuesto RAM7. Al comparar las actividades de este con el compuesto DA2P1, tenemos que DA2P1 supera en un 19,5%_(TA3) y 91,9%_(TA3-MTX-R) la potencia de RAM7. Sobre la línea celular de linfocitos T tenemos que RAM7 disminuye su potencia en 13,7%_(CCRF-CEM) y 24,3%_(CEM/C2) respecto de la alcanzada por DA2P1. Concerniente a la línea no tumoral VERO el compuesto RAM7 tiene un 27,6% de menor potencia que DA2P1. (DA2P1 tiene: 1,19_(TA3), 1,92_(TA3-MTX-R), 1,14_(CCRF-CEM), 1,24_(CEM/C2) y 1,28_(VERO) veces la pot. de RAM7).

Al comparar las actividades de RAM7 sobre las células sensibles y sus variantes resistentes, tenemos que: RAM7 es sobre TA3-MTX-R 95% menos potente que sobre TA3 y es 19,8% menos potente sobre CEM/C2 que sobre CCRF-CEM. (DA2P1: 21,4% y 8,82% respectivamente). RAM7 es menos activo sobre las sublíneas resistentes que sobre las respectivas sensibles y se destaca la diferencia observada entre las células de tumor mamario de ratón.

RAM7 muestra una menor inhibición del crecimiento sobre las células normales VERO que la generada sobre células tumorales, disminuye la actividad un 30,4%_(TA3) y 41,2%_(CCRF-CEM) respecto de la observada en VERO. (DA2P1: 34,5%_(TA3) y 25,6%_(CCRF-CEM) menos potencia en VERO). El compuesto AM7 posee una selectividad cercana a la observada por DA2P1, siendo menos potente sobre células normales.

DA2P1 ^v/_s DA2P2:

DA2P2 es un diastereoisómero del compuesto DA2P1, poseen los mismos sustituyentes. A diferencia de DA2P1 el compuesto DA2P2 tiene el grupo funcional -CH₂OH sobre el carbono 8 y el anillo alquílico se encuentra fusionado a la cara *h*. Esta orientación de los grupos funcionales hizo que la eficacia disminuyera en un 20,5%_(TA3) y 21,7%_(TA3-MTX-R) en presencia de CCCP, en cuanto a las mediciones en ausencia de CCCP la eficacia disminuyó en 22,3%_(TA3) y 19,9%_(TA3-MTX-R). La eficacia frente a la activación de la respiración presentó un descenso de 19%_(TA3) y 10,4%_(TA3-MTX-R). Ahora vemos que la eficacia tanto en la inhibición de la respiración como frente a la activación de esta se ve afectada de forma negativa por los cambios estructurales de DA2P2 respecto de DA2P1. Los experimentos sobre la respiración celular arrojaron resultados de IC50 disminuidos para el compuesto DA2P2 respecto de DA2P1, reflejando un gran descenso en su potencia. El compuesto DA2P1 es 541%_(TA3) y 559%_(TA3-MTX-R) más potente que su contraparte DA2P2 (DA2P1 tiene 6,41_(TA3) y 6,59_(TA3-MTX-R) veces la potencia DA2P2). En este caso similar a lo observado en las comparaciones con DA1 tenemos una disminución importante en la actividad de DA2P2 frente a su acción sobre la respiración celular.

Las mediciones de viabilidad mostraron que DA2P1 supera en actividad al compuesto DA2P2 en un 13,4%_(TA3) y 21,3%_(TA3-MTX-R) frente a las células de tumor mamario de ratón. También se observó que DA2P1 supera en 7,2%_(CCRF-CEM) y 5,9%_(CEM/C2) en células de tumor de linfocitos T a DA2P2. En las células VERO la inhibición del crecimiento por parte de DA2P1 es 5,48% mayor, comparado con el compuesto DA2P2. (DA2P1 tiene: 1,13_(TA3), 1,21_(TA3-MTX-R), 1,07_(CCRF-CEM), 1,06_(CEM/C2) y 1,06_(VERO) veces la pot. de DA2P2). Por lo visto el compuesto DA2P2 disminuye su actividad respecto del compuesto DA2P1, sin embargo, esta disminución en la potencia es mucho menor a la ocurrida sobre la inhibición de la respiración.

En las actividades, que DA2P2 presentó en células TA3-MTX-R, se observó una disminución de la potencia de un 30% comparado con la línea sensible TA3, sobre CEM/C2 hubo un descenso del 8,3% respecto CCRF-CEM (DA2P1:21,4% y 8,82% respectivamente). Las actividades se presentaron más potentes sobre células sensibles que sobre células resistentes.

Al comparar las actividades sobre células normales VERO y sus contrapartes tumorales podemos observar que DA2P2 es sobre TA3 20,4% más potente y sobre CCRF-CEM 33,2% más

potente que sobre células VERO (DA2P1: 34,5%_(TA3) y 25,6%_(CCRF-CEM) menos potencia en VERO). DA2P2 presentó una cierta selectividad sobre células tumorales.

DA2P2 ^{v/s} RAM9:

Hay una interesante relación entre DA2P2 y el compuesto RAM9, observamos anteriormente que la actividad del compuesto DA2P2 es menor en efectividad y potencia respecto de DA2P1 y que este es un diastereoisómero de DA2P1 en el cual se encontraban opuestos los grupos funcionales sobre el anillo B, ahora bien RAM9 es una variación de DA2P2 en cuya estructura se ha suprimido el anillo alquílico fusionado a la cara *h* y se ha reemplazado por un metilo sobre el carbono C5, o también puede verse como un diastereoisomero del compuesto RAM7 en cual se han invertido sus sustituyentes sobre el anillo B quedando la función alcohol metílico sobre el C8 y el metilo sobre el C5. Anteriormente se mostró que la supresión del anillo alquílico fusionado sobre la cara *j* disminuía la actividad en los experimentos de viabilidad, no así en inhibición de la respiración (En el caso de RAM7 respecto de DA2P1). Sin embargo, ahora se observa que la actividad de RAM9 es superior a la presentado por DA2P2, tanto en su eficacia como su potencia. La efectividad de RAM9 sobre la inhibición de la respiración es un 13,5%_(TA3) y 7,4%_(TA3-MTX-R) mayor que aquella presentada por DA2P2 (RAM9 tiene 5,0_(TA3) y 4,14_(TA3-MTX-R) veces la potencia DA2P2). La potencia de RAM9 sobre la inhibición de la respiración es 80%_(TA3) y 75,8%_(TA3-MTX-R) mayor que la actividad mostrada por DA2P2 (RAM9 tiene 5,0_(TA3) y 4,14_(TA3-MTX-R) veces la potencia DA2P2).

Los experimentos de viabilidad mostraron decrementos en la potencia del compuesto RAM9 con ausencia del anillo cicloalcano fusionado. Sobre células TA3 mostró que DA2P2 es 46,2% más potente, en cambio sobre la sublínea resistente TA3-MTX-R la diferencia fue mayor, 69,9% más potente que el compuesto RAM9. Sobre células CEM y CEM/C2 el compuesto DA2P2 tiene resultados sobre la potencia de inhibición del crecimiento de un 42,1% y 45,1% mayor que aquellos obtenidos con RAM9. En cuanto a las células normales VERO estos resultados mostraron que DA2P2 es un 46,7% más potente que RAM9. (DA2P2 tiene: 1,46_(TA3), 1,69_(TA3-MTX-R), 1,42_(CCRF-CEM), 1,45_(CEM/C2) y 1,47_(VERO) veces la pot. de RAM9). Por lo tanto la ausencia del

ciclohexano genera una menor potencia sobre la inhibición del crecimiento frente a los distintos tipos celulares, tanto tumorales como normales.

Al comparar las actividades sobre células tumorales sensibles y resistentes se obtuvo que RAM9 es 51% menos activo sobre la línea resistente TA3-MTX-R que sobre TA3 y 10,6% menos sensible sobre la línea resistente CEM/C2 que sobre la línea CCRF-CEM. (DA2P2:30% y 8,3% respectivamente). RAM9 posee una actividad mayor sobre células sensibles respecto de las resistentes.

Por último al comparar las actividades sobre células VERO con aquellas obtenidas sobre células tumorales se determinó que el compuesto RAM9 presenta más potencia sobre estas últimas, esto es un 18,9%(TA3) y 33,9%(CCRF-CEM) más potente que sobre células VERO. (DA2P2: 20,4%(TA3) y 33,2%(CCRF-CEM) menos potencia en VERO). El compuesto RAM9 presenta una selectividad mayor que la mostrada por DA2P2 respecto de células tumorales y normales.

RAM9 ^{v/s} RAM7:

Los compuestos RAM9 y RAM7 muestran una relación estructural similar a la que existe entre los compuestos DA2P1 y DA2P2, estos son diastereoisómeros que presentan una inversión de sus grupos sustituyentes en el anillo B, la diferencia es que los compuestos RAM9 y RAM7 no poseen el anillo alquílico fusionado y en reemplazo de este se tiene un grupo metilo, por lo tanto tenemos que en RAM7 existe un grupo metilo sobre el C8 y un metanol sobre el C5, en cambio RAM9 presenta un grupo metilo sobre el C5 y un metanol sobre el C8, el resto de los sustituyentes se mantienen como en el compuesto DA2P1. La orientación del grupo funcional -CH₂OH generó características distintas en las actividades de los compuestos, tanto en efectividad como en potencia el compuesto RAM7 superó al compuesto RAM9. En cuanto a la efectividad sobre la inhibición de la respiración RAM7 mostró una superioridad mínima sobre RAM9, 1,85%(TA3), en cambio sobre la línea resistente RA3-MTX-R el compuesto RAM9 superó en un 2,19% la efectividad de RAM7. Los experimentos de inhibición de la respiración celular revelaron que RAM7 presenta más potencia que RAM9, 153,5%(TA3) y 225,3%(TA3-MTX-R) más potente que RAM9 (RAM7 tiene 2,53_(TA3) y 3,25_(TA3-MTX-R) veces la potencia RAM9). Entonces se

tiene que, al revisar los datos sobre respiración celular, aunque la orientación del grupo alcoholico no afecta de manera relevante la efectividad si lo hace sobre la potencia.

En viabilidad también se muestra una superioridad en la potencia de RAM7 sobre RAM9 aunque de menor magnitud que sobre la inhibición de la respiración celular. RAM7 es 38,7 %_(TA3) y 7,36%_(TA3-MTX-R) más potente que RAM9 y 34,0%_(CCRF-CEM) y 23,7%_(CEM/C2) más potente que RAM9. Sobre células VERO RAM7 presenta 19,2% más potencia que RAM9. (RAM7 tiene: 1,39_(TA3), 1,07_(TA3-MTX-R), 1,34_(CCRF-CEM), 1,24_(CEM/C2) y 1,19_(VERO) veces la pot. de RAM9).

Por último cabe decir que, como antes se comprobó al analizar los resultados del compuesto DA1, la presencia del grupo funcional metanol es importante para la actividad de estos compuestos y esto se puede complementar también a raíz del análisis de los resultados obtenidos en los experimentos con RAM9 y RAM7, frente a los cuales está patente que la orientación de este grupo dentro del anillo antracénico es también de importancia, siendo la disposición sobre el carbono 5 más ventajosa que sobre el carbono 8.

Conclusión

- El compuesto DA7P1 resulto ser el más activo de la serie. Su capacidad para inhibir la respiración celular superó por sobre el 80% la potencia de DA2P1. También mostró superioridad en las pruebas de viabilidad sobre los cinco tipos celulares probados (TA3, TA3-MTX-R, CCRF-CEM, CEM/C2, VERO). Alargar las cadenas alquílicas sobre el C4, desde metilo a etilo, aumenta la actividad considerablemente. Probablemente este efecto lo genera el aumento de lipofilia del compuesto.
- El grupo alcohol metílico sobre el anillo B resultó ser de gran importancia para la actividad de los compuestos. En el caso de DA1, en el cual se ha reemplazado este grupo funcional por una esterificación, la potencia sobre la inhibición de la respiración fue considerablemente menor. DA1 presentó una potencia sobre 16 veces menos que el compuesto DA2P1 que tiene el grupo funcional anteriormente aludido. En los ensayos de viabilidad aunque la magnitud de la disminución de la actividad fue menor igualmente es considerable, alrededor de dos veces menos actividad que DA2P1 sobre todos los tipos celulares.
- La ubicación del grupo funcional alcohol metílico demostró ser relevante, se observó que no solo su presencia sino que también su orientación dentro de la molécula afectan la potencia. El compuesto RAM7, cuyo grupo funcional - CH₂OH se encuentra sobre el C5, mostró ser alrededor de 3 veces más potente que RAM9 ante la inhibición de la respiración celular. En la inhibición del crecimiento RAM7 muestra ser entre 20% a 30% más potente que RAM9.

- La relación estructura-actividad en cuanto a la presencia o ausencia del ciclohexano fusionado sobre el anillo B del núcleo antracénico mostró que : existe una disminución sobre la potencia ante la inhibición de la respiración de aquellos compuestos presencia del ciclohexano. Dos relaciones demuestran esta aseveración: DA2P1, compuesto cuya fusión con el ciclohexano es sobre la cara *j*, muestra una potencia 2 veces menor aprox. que RAM7 el cual se encuentra desprovisto del ciclohexano y en cuanto a DA2P2 respecto de RAM9, relacionados de forma similar a la anteriormente descrita a excepción de que la fusión se encuentra sobre la cara *i* del compuesto DA2P2, en este caso el primero es alrededor de 5 veces menos potente que el segundo.
- Sobre los efectos medidos en viabilidad la presencia del ciclohexano fusionado, al contrario de lo ocurrido sobre la inhibición de la respiración, favorece la potencia en la inhibición del crecimiento celular. La relación entre DA2P1 y RAM7 como la de DA2P2 y RAM9, ofrecen resultados similares en donde es posible observar que la presencia del ciclohexano permite una mayor potencia por parte de los compuestos DA2P1 y DA2P2 (alrededor del 20% al 30% más potente DA2P1 respecto de RAM7 y entre el 40% a 50% mayor la potencia de DA2P2 que la observada en RAM9).

En cuanto a las efectividades observadas en los compuestos tenemos que:

- Aquel con mayor efectividad de la serie es el compuesto DA2P1, todas las variaciones respecto de este compuesto acabaron por disminuirla, en mayor o menor cantidad.
- En las variaciones en las cuales ha estado comprometida la función alcohol metílico la disminución de la efectividad se vio afectada en mayor magnitud respecto de la observada en DA2P1. Es así que en el caso del compuesto DA1, en el cual se encuentra una esterificación sobre el C4 reemplazando al -CH₂OH, esta disminuyó alrededor del 20% al 40%. Al relacionar el compuesto DA2P2, en el cual se ha invertido la posición del grupo funcional -CH₂OH (sobre el C8) respecto del compuesto DA2P1 (-CH₂OH sobre el C5) la efectividad disminuye alrededor del 20%. La excepción a esto la generan

los compuestos RAM7 (-CH₂OH sobre el C5) y RAM9(-CH₂OH sobre el C8), a pesar de tener este grupo funcional opuesto sus efectividades son prácticamente iguales. Por lo tanto el grupo funcional -CH₂OH está probablemente relacionado con la formación de complejos ligando-receptor y/o eficacia del receptor.

En relación a la selectividad:

- La respuesta celular en general fue mayor sobre células sensibles (TA3,CCRF-CEM) que sobre las sublíneas celulares resistentes (TA3-MTX-R, CEM/C2). Alrededor del 30% más potencia sobre células sensibles de tumor mamario de ratón que su variante resistente. Sobre tumor de linfocitos T respecto de la variante resistente se observó entre un 8% a 12% más potencia.
- El compuesto RAM7 presentó una mayor diferencia en las actividades sobre células sensibles y resistentes, para las dos líneas celulares. 95% más actividad sobre TA3 que sobre TA3-MTX-R y 19,8% más potencia sobre CCRF-CEM que sobre CEM/C2.
- Las actividades sobre células tumorales fueron en general mayores que las observadas sobre células normales de riñón de mono verde africano (VERO). Alrededor de un 20% más potencia sobre TA3 y de un 30 a 40% de mayor potencia sobre CCRF-CEM.
- RAM7 mostró tener una mayor selectividad ente células normales VERO y tumorales, se observó un 30% de mayor potencia sobre TA3 y 41,2 % de mayor potencia sobre CCRF-CEM.

Referencias

1. O'Brien, P. J. *Chem. Biol. Interact.* **1991**, *80*, 1.
2. Brunmark, A.; Cadenas, E. *Free Radic. Biol. Med.* **1989**, *7*, 435.
3. Powis, G. *Free Radic. Biol. Med.* **1989**, *6*, 63.
4. Pedersen, P. *Prog. Exp. Tumor.* **1978**, *22*, 190.
5. McCabe, E. *Biochem. Med. Metab. Biol.* **1992**, *47*, 105.
6. Wilkie, D. J. R. *Soc. Med.* **1979**, *72*, 599.
7. Dove, S.; Coats, E.; Scharfenberg, P.; Franke, R. J. *Med. Chem.* **1992**, *28*, 447.
8. Stevens, M. F. G.; McCall, C. J.; Lelieveld, P.; Alexander, P.; Richter, A.; Davies, D. E. *J. Med. Chem.* **1994**, *37*, 1689.
9. Pavani, M.; Fones, E.; Oksenberg, D.; Garcí a, M.; Hernandez, C.; Cordano, G.; Muñoz, S.; Mancilla, J.; Guerrero, A.; Ferreira, J. *Biochem. Pharmacol.* **1994**, *48*, 1935.
10. M. Picardo, S. Passi, M. Mazzaro-Porro, A. Breathnach, C. Zompetta, A. Faggioni and P. Riley, *Biochem. Pharmacol.* **1987**, *36*, 417
11. Phelps, D. C.; Crane, F. L. *Biochemistry.* **1975**, *14*, 166.
12. Makawity, D. M.; Konji, V. N.; Olowookere, J. O. *FEBS Lett.* **1990**, *266*, 26.
13. Stevens, M. F. G.; McCall, C. J.; Lelieveld, P.; Alexander, P.; Richter, A.; Davies, D. E. *J. Med. Chem.* **1994**, *37*, 1689.
14. Burton, G. W.; Doba, T.; Gabe, E. J.; Hughes, L.; Lee, F. L.; Prasad, L.; Ingold, K. U. *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 7053.
15. Hammerich, O.; Svensmark, B. In *Organic Electrochemistry*; Lund, H., Baizer, M., Eds.; Marcel Dekker: New York, **1990**, 616.
16. Aruoma, O.; Murcia, A.; Butler, J.; Halliwell, B. *J. Agric. Food. Chem.* **1993**, *41*, 1880.
17. Cao, G.; Sofic, E.; Prior, R. L. *Free Radic. Biol. Med.* **1997**, *22*, 749.
18. Khan, N. S.; Ahmad, A.; Hadi, S. M. *Chem. Biol. Interact.* **2000**, *125*, 177.
19. Azam, S.; Hadi, N.; Khan, N. U.; Hadi, S. M. *Toxicol. In Vitro.* **2004**, *18*, 555.
20. Gomes, C. A.; Girao da Cruz, T.; Andrade, J. L.; Milhazes, N.; Borges, F.; Marques, M. P. *M. J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 5395.
21. Agullo, G.; Gamet-Payrastre, L.; Manenti, S.; Viala, C.; Re´me´sý, C.; Chap, H.; Payrastre, B. *Biochem. Pharmacol.* **1997**, *53*, 1649.

22. Sergediene, E.; Jo'nsson, K.; Szymusiak, H.; Tyrakowska, B.; Rietjens, I. M. C. M.; Cenas, N. *FEBS Lett.* **1999**, *462*, 392.
23. Gomes, C. A.; Girao da Cruz, T.; Andrade, J. L.; Milhazes, N.; Borges, F.; Marques, M. P. *M. J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 5395.
24. Agullo, G.; Gamet-Payraastre, L.; Manenti, S.; Viala, C.; Re´me´sý, C.; Chap, H.; Payraastre, B. *Biochem. Pharmacol.* **1997**, *53*, 1649.
25. Sergediene, E.; Jo'nsson, K.; Szymusiak, H.; Tyrakowska, B.; Rietjens, I. M. C. M.; Cenas, N. *FEBS Lett.* **1999**, *462*, 392.
26. Yoshida, M.; Sakai, T.; Hosokawa, N.; Marui, N.; Matsumoto, K.; Fujioka, A.; Nishino, H.; Aoike, A. *FEBS Lett.* **1990**, *260*, 10.
27. Hosokawa, N.; Hosokawa, Y.; Sakai, T.; Yoshida, M.; Marui, N.; Nishino, H.; Kawai, K. *Int. J. Cancer* **1990**, *45*, 1119.
28. Selassie, C. D.; Shusterman, A. J.; Kapur, S.; Verma, R. P.; Zhang, L.; Hansch, C. J. *Chem. Soc. Perkin Trans.* **1999**, 2729.
29. Sergediene, E.; Jo'nsson, K.; Szymusiak, H.; Tyrakowska, B.; Rietjens, I. M. C. M.; Cenas, N. *FEBS Lett.* **1999**, *462*, 392.
30. Selassie, C. D.; Garg, R.; Kapur, S.; Kurup, A.; Verma, R. P.; Mekapati, S. B.; Hansch, C. *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 2585
31. Phelps, D. C.; Crane, F. L. *Biochemistry.* **1975**, *14*, 166.
32. Degli Esposti, M.; Rotillo, G.; Lenaz, G. *Biochim. Biophys.* **1984**, *767*, 10.
33. Makawity, D. M.; Konji, V. N.; Olowookere, J. O. *FEBS Lett.* **1990**, *266*, 26.
34. Stevens, M. F. G.; McCall, C. J.; Lelieveld, P.; Alexander, P.; Richter, A.; Davies, D. E. J. *Med. Chem.* **1994**, *37*, 1689.
35. Elliger, C. A.; Henika, P. R.; MacGregor, J. T. *Mutation.* **1984**, *135*, 77.
36. Araya-Maturana, R.; Delgado-Castro, T.; Ga´rate, M.; Ferreira, J.; Pavani, M.; Pessoa-Mahana, H.; Cassels, B.K. *Bioorg. Med. Chem.* **2002**, *10*, 3057.
37. Pedersen, P. *Prog. Exp. Tumor.* **1978**, *22*, 190.
38. Shinohara, Y.; Sagawa, I.; Ichihara, J.; Yamamoto, K.; Terao, K.; Terada, H. *Biochim. Biophys.* **1997**, *1319*, 319.
39. Baggetto, L. *Eur. J. Cancer.* **1993**, *29A*, 156.
40. Wilkie, D. J. *Roy. Soc. Med.* **1979**, *72*, 599.

41. Avila, D. V.; Ingold, K. U.; Lusztyk, J. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 2929.
42. Muramatsu, H.; Kogawa, K.; Tanaka, M.; Okumura, K.; Nishihori, Y.; Koike, K.; Kuga, T.; Niitsu, Y. *Cancer.* **1995**, *55*, 6210.
43. Leanderson, P.; Faresjo, A. O.; Tagesson, C. *Free Radic. Biol. Med.* **1997**, *23*, 235.
44. Aruoma, O.; Murcia, A.; Butler, J.; Halliwell, B. *J. Agric. Food. Chem.* **1993**, *41*, 1880.
45. Cao, G.; Sofic, E.; Prior, R. L. *Free Radic. Biol. Med.* **1997**, *22*, 749.
46. Khan, N. S.; Ahmad, A.; Hadi, S. M. *Chem. Biol. Interact.* **2000**, *125*, 177.
47. Azam, S.; Hadi, N.; Khan, N. U.; Hadi, S. M. *Toxicol. In Vitro.* **2004**, *18*, 555.
48. Halliwell, B. *Biochem. Pharmacol.* **1995**, *49*, 1341.
49. Khan, N. S.; Ahmad, A.; Hadi, S. M. *Chem. Biol. Interact.* **2000**, *125*, 177.
50. Azam, S.; Hadi, N.; Khan, N. U.; Hadi, S. M. *Toxicol. In Vitro.* **2004**, *18*, 555.
51. Gomes, C. A.; Giraõ da Cruz, T.; Andrade, J. L.; Milhazes, N.; Borges, F.; Marques, M. P. *M. J. Med.Chem.* **2003**, *46*, 5395.
52. Agullo´, G.; Gamet-Payrastre, L.; Manenti, S.; Viala, C.; Re´me´sý, C.; Chap, H.; Payrastre, B. *Biochem. Pharmacol.* **1997**, *53*, 1649.
53. Sergediene, E.; Jonsson, K.; Szymusiak, H.; Tyrakowska, B.; Rietjens, I. M. C. M.; C´e´nas, N. *FEBS Lett.* **1999**, *462*, 392.
54. Yoshida, M.; Sakai, T.; Hosokawa, N.; Marui, N.; Matsumoto, K.; Fujioka, A.; Nishino, H.; Aoike, A. *FEBS Lett.* **1990**, *260*, 10.
55. Hosokawa, N.; Hosokawa, Y.; Sakai, T.; Yoshida, M.; Marui, N.; Nishino, H.; Kawai, K. *Int. J. Cancer.* **1990**, *45*, 1119.
56. Selassie, C. D.; Shusterman, A. J.; Kapur, S.; Verma, R. P.; Zhang, L.; Hansch, C. *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* **1999**, 2729.
57. Brunmark, A. *Free Radic. Biol. Med.* **1989**, *7*, 435.
58. O'Brien. *Chem. Biol. Interact.* **1991**, *80*, 1.
59. Roginsky, V.; Barsukova, T.; Loshadkin, D.; Pliss, E. *Chem. Phys. Lipids.* **2003**, *125*, 49.
60. Barclay, L. R. C.; Vinqist, M. R.; Mukai, K.; Itoh, S.; Marinoto, H. *J. Org. Chem.* **1993**.
61. Florenti, D.; Cabrini, L.; Landi, L. *Free Radic. Commun.* **1993**, *18*, 201.
62. Shi, H.; Noguchi, N.; Niki, E. *Free Radic. Biol. Med.* **1999**, *27*, 334.
63. Nohl, H.; Gille, L.; Kozlov, A. V. *Free Radic. Biol. Med.* **1998**, *25*, 666.
64. Pozo-Insfran D, C H Brenes, S O S Saldivar, S T Talcote, **2006**; Adom y Liu. 2002

65. Halliwell, B. *Antioxidant characterization. Methodology and mechanism. Pharmacol.* **1995**, 49, 1341.
66. Shahidi F y Naczki M. *Foods phenolics. Sources, Chemistry, Effects, Application.* Technomic, Publishing CO., INC eds. Lancaster, Pennsylvania, USA, **1995**.
67. Velioglu. 1998; Proestos. **2005**.
68. Hertog, M.G., E.J. Feskens, P.C. Hollman, M.B. Katan & D. Kromhout . **1993**, 342, 1007.
69. Special Expert Committee of the German Federal Institute for Drugs and Medical Advice. *Therapeutic Guide to Herbal Medicines.* Washington, DC: Mark Bhrmental Senior Editor, **1998**, 489.
70. Ferguson L.R. *Inhibitors of topoisomerase II enzymes: a unique group of environmental mutagens and carcinogens.* **1998**, 400, 271.
71. Ferguson L.R. *Role of plant polyphenols in genomic stability.* **2001**, 475, 89.
72. Abalea V, Cillard J, Dubos M.P, Sergent O, Cillard P, More I. *Repair of iron-induced DNA oxidation by the flavonoid myricetin in primary rat hepatocyte cultures, Free Rad. Biol. Med.* **1999**, 26, 1457.
73. Skibola C, Smith M. *Potential health impacts of excessive flavonoid intake. Free Radl Biol Med.* **2000**, 29 (3-4):375-83.
74. O'Brien, P. *J. Chem. Biol. Interact.* **1991**, 80, 1.
75. Brunmark, A.; Cadenas, E. *Free Radic. Biol. Med.* **1989**, 7, 435.