

## **1. Introducción**

### **1.1. Cáncer y Parasitosis. Problema mundial**

El aumento en la esperanza de vida, debido fundamentalmente a la higiene y a contar con un importante arsenal terapéutico general, es lo que ha conducido a que las neoplasias y parasitosis se hayan convertido en un problema sanitario fundamental. En los países desarrollados el cáncer es la segunda causa de muerte con tendencia a convertirse en la primera. Uno de los tratamientos de esta enfermedad consiste en la quimioterapia, si bien con resultados francamente limitados, ya que el índice de curaciones es inferior al 10%. Paralelamente, en los países en vías de desarrollo, lamentablemente, uno de los problemas de salud más importantes lo constituyen las parasitosis, afectando las más graves, como la malaria y la tripanosomiasis, a muchos millones de personas, con consecuencias trágicas sobre los enfermos.<sup>1</sup>

Por otro lado, la sombra de estas enfermedades parasitarias amenaza hoy por hoy a los habitantes de los llamados países desarrollados. Los intercambios culturales y turísticos, fruto de la globalización del planeta y los procesos de inmunodepresión ligados a ciertas enfermedades, han hecho renacer el fantasma de estas dolencias allí donde se pensaba que habían sido definitivamente erradicadas.<sup>2-4</sup> Es por esto que el diseño y desarrollo de fármacos frente a estas enfermedades genera un creciente interés en la comunidad científica internacional, ocupando el lugar dejado por las grandes empresas farmacéuticas que no encuentran estímulo en hacer inversiones en

donde no se esperan grandes beneficios económicos.<sup>5</sup> La raíz de este problema es el alto costo de las inversiones y la falta de un mercado potencial y seguro en los países en desarrollo. De las 1393 nuevas drogas desarrolladas entre 1975 y 1999, menos de 1,1% fueron para las enfermedades tropicales y la tuberculosis.<sup>6</sup>

Las enfermedades tropicales producidas por parásitos unicelulares y los diferentes tipos de cáncer que atacan a la población mundial, se consideran la causa de las enormes pérdidas en vidas humanas y los elevadísimos costos económicos debido a su morbilidad.<sup>5</sup>

Sumado, a estos inconvenientes cabe señalar que la mayoría de los fármacos disponibles para estas enfermedades no son fáciles de manejar, requieren tratamientos largos y costosos y no están libres de efectos colaterales indeseables.<sup>2-4</sup> Por tal motivo, hay una urgente necesidad de plantear nuevas estrategias para encontrar nuevos compuestos eficaces y con baja toxicidad basadas no solamente en el diseño racional de drogas y en la búsqueda de productos naturales, sino también, en identificar nuevas dianas farmacológicas como potenciales blancos para el desarrollo de nuevas drogas y poder tomar ventaja de otros compuestos ya en uso contra otras enfermedades humanas.

En la búsqueda de un aporte científico a la medicina, nuestro grupo se planteó el uso de una nueva estrategia que ayuden a la investigación y el desarrollo de nuevos fármacos, contra aquellas enfermedades consideradas un problema de salud mundial y que en la actualidad no cuentan con un amplio arsenal

terapéutico, tanto en países desarrollados como en países en vías de desarrollo; una de las estrategias más utilizadas en la actualidad consiste en ensayar drogas ya en uso o nuevas drogas sintetizadas contra otras patologías, en aquellas enfermedades consideradas un problema de salud importante para la población como lo son el cáncer y las parasitosis, entre ellas la enfermedad de Chágas. Considerando también, el estudio de nuevas dianas farmacológicas comunes en ambas patologías, para así establecer nuevos blancos terapéuticos que permitan el ensayo de drogas ya en uso o la optimización de una serie en una u otra enfermedad.

## **1.2. Aspectos comunes entre Cáncer y Parasitosis**

Los tratamientos de las enfermedades tumorales y parasitarias presentan ciertos aspectos químico-farmacéuticos comunes.

Entre las analogías y diferencias en la biología celular de las células tumorales y la de los protozoos, se puede tomar en consideración como aspectos comunes, la velocidad de proliferación celular, la capacidad de eludir el sistema inmunológico y que en la metástasis la célula neoplásica se comporte casi como una ameba. Obviamente, hay diferencias como la permeabilidad de la pared celular, que marcará dramáticamente la posibilidad de alcanzar las dianas farmacológicas.<sup>1</sup>

En consecuencia, estos aspectos químicos-biológicos comunes despiertan el interés hacia el diseño de nuevos fármacos que sean ensayados en ambos campos; tanto en las neoplasias como en las parasitosis, con la finalidad de

obtener la optimización de una serie o el origen de nuevos productos terapéuticos.<sup>1</sup>

Un ejemplo de fármacos comunes para el tratamiento de estas patologías son las ADN topoisomerasas, una diana terapéutica potencial de los fármacos antitumorales, debido a su posición estratégica en la síntesis del ADN y cuya efectividad frente a enfermedades tropicales causadas por parásitos unicelulares está en fase de investigación.<sup>5</sup>

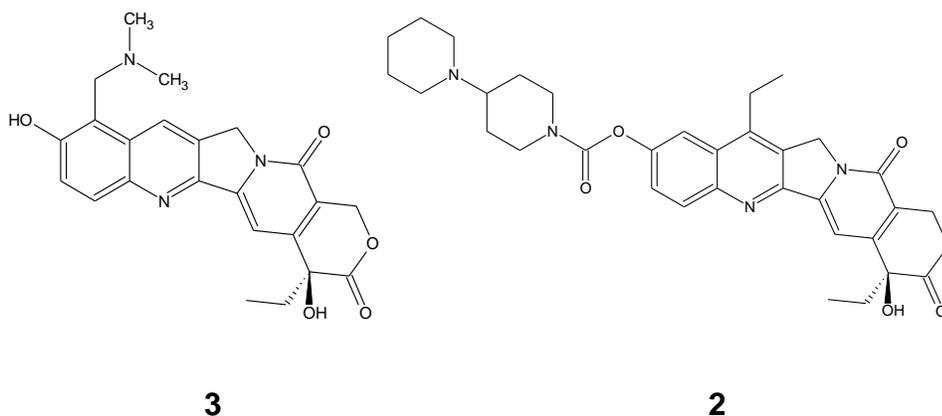
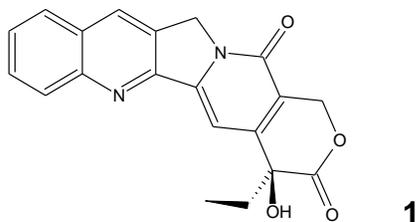
Se han caracterizado tres tipos de ADN topoisomerasas: las ADN topoisomerasas de tipo I (TOPI, subtipos IA y IB) y las ADN topoisomerasas de tipo II (TOPII).<sup>5</sup> Las TOPII, se han identificado y expresado funcionalmente las de varios parásitos como: *P. falciparum*,<sup>7</sup> *Cryptosporidium parvum*,<sup>8</sup> *T. brucei*,<sup>9</sup> *T. cruzi*<sup>10</sup> y varias especies del género *Leishmania*,<sup>11,12</sup> sin que existan grandes diferencias morfológicas o cinéticas con las de sus correspondientes hospedadores.<sup>5</sup> Al contrario de lo que sucede con las TOPII, la TOPI humana (hTOPI) es una enzima monomérica, mientras que, las TOPI de tripanosomas y leishmanias difieren significativamente de la hTOPI, encontrándose que en estos microorganismos la TOPI existe como una proteína dimérica.<sup>13,14</sup>

El reciente descubrimiento de una TOPI en tripanosomátidos que difiere estructuralmente de la del hospedador, así como su diferente grado de expresión durante los procesos de crecimiento rápido, ha abierto una nueva ventana al diseño de moléculas que actúen específicamente sobre la forma del parásito.<sup>15-17</sup>

Un fármaco con actividad antitumoral, potente inhibidor no competitivo de la TOPI es el alcaloide natural pentacíclico camptotecina **1** (CPT).<sup>18,19</sup> Este mecanismo de acción de la CPT ha sido comprobado en parásitos protozoos de interés médico (*P. falciparum*, *T. brucei*, *L. donovani*, *C. parvum*).<sup>20</sup> La CPT induce la formación de complejos de escisión en el interior del núcleo de las formas intraeritrocíticas de *P. falciparum* lo que origina la muerte del parásito a concentraciones micromolares del fármaco. Estudios de relación estructura/actividad (QSAR) de una serie de análogos de la CPT sobre tripomastigotes de *T. brucei*, demostró que su citotoxicidad se correlacionaba con la capacidad de formación de complejos de escisión con el ADN y la enzima.<sup>21</sup> Estudios más recientes han revelado que los derivados hidrosolubles de la CPT, irinotecan **2** y topotecan **3**, que se utilizan clínicamente como fármacos antitumorales, tienen un efecto citotóxico reducido frente a las formas sanguíneas de *T. brucei*, concluyendo que la reducida eficacia de estos compuestos se debe más a su baja permeabilidad para atravesar la membrana del parásito que a su eficacia de formar complejos de escisión.<sup>22</sup>

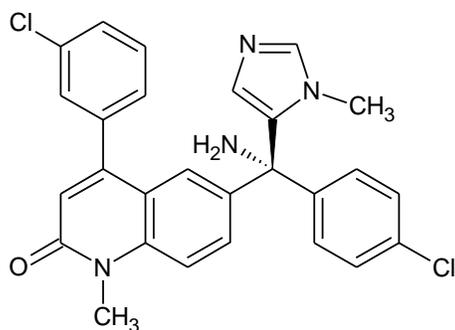
La estructura dimérica, única de la enzima de tripanosomátidos y su localización dual asociada tanto al ADN genómico como al ADN del cinetoplasto la convierte en una atractiva diana para la creación y desarrollo de nuevos fármacos. A pesar del elevado número de inhibidores de la TOPI ensayados frente a células tumorales y de que algunos de estos compuestos se encuentran en fases de evaluación clínica, se dispone de información muy escasa en cuanto a su efecto terapéutico frente a tripanosomatidos y otros parásitos. Los buenos resultados

obtenidos in vitro frente algunos de estos microorganismos, así como el reciente descubrimiento de un mecanismo de muerte celular, semejante a la apoptosis del hospedador, inducida por los inhibidores de clase I, urgen a ensayar estos compuestos como antibióticos antiprotozoarios.<sup>5</sup>



Existen otras dianas terapéuticas potenciales para los fármacos antitumorales, que hoy día se encuentran en estudio para el tratamiento de las enfermedades parasitarias, como lo es el sistema de transmisión de señales involucrado en el crecimiento y diferenciación celular. El bloqueo específico de puntos pertenecientes al sistema de transmisión de señales podría traer como consecuencia que la respuesta de la célula disminuya o no se produzca. Una de las proteínas más estudiada es la Ras, la cual para ejercer su función debe sufrir una reacción previa de prenilación que consiste en la adición de una “cola” o fragmento formado por farnesil o geranil-geranil, lo que permite que la

proteína se pueda anclar en la membrana celular. Este proceso es catalizado por la enzima farnesil transferasa (PFT) y geranio-geranil transferasa, respectivamente. Este comportamiento molecular ofrece un blanco terapéutico bien definido para “desconectar” a la Ras e interrumpir la información que esta transmite, la cual está relacionada con la producción de señales para transformación y el crecimiento incontrolado de células tumorales malignas.<sup>23</sup> Por tanto, los inhibidores de las enzimas que catalizan esta modificación, es decir, las farnesil transferasas evitarán la unión a la membrana de la proteína Ras y bloquearán el crecimiento aberrante de tumores transformados por Ras. Por lo que, se acepta generalmente, que los inhibidores de la farnesil transferasa pueden ser muy útiles como agentes antineoplásicos para tumores en los que Ras contribuye a la transformación.<sup>24</sup> En esa búsqueda incesante de otros modelos de tratamiento para enfermedades parasitarias, como la enfermedad de Chagas, que afecta un estimado de 13 millones de personas en Latinoamérica, recientemente, se reportó un fármaco antineoplásico inhibidor de la enzima PFT que se encuentra en ensayos clínicos en fase III, el tipifarnib **4**, el cual se ensayó con el interés de explotar la PFT de *T. cruzi* como un blanco para nuevas drogas; encontrándose inesperadamente que el tipifarnib es capaz de inhibir la síntesis de esteroides endógenos en *T. cruzi* a concentraciones mucho menores que la  $CI_{50}$  (concentración inhibitoria cincuenta) encontrada contra la enzima PFT de *T. cruzi*.<sup>25,26</sup>



4

Como se ha venido comentando desde un principio, se han presentado distintos grupos de fármacos con características estructurales semejantes y con actividad en dos áreas terapéuticas diferentes, como el tratamiento de las neoplasias y las enfermedades parasitarias. Por tanto, parece justificado que cualquier fármaco activo en uno de los campos sea ensayado en el otro, y así lograr la optimización de una serie o el origen de nuevos productos terapéuticos; sobre todo en aquellas enfermedades desatendidas en los países en vías de desarrollo.

### 1.3. El Cáncer

El Cáncer es una enfermedad cuya existencia es conocida desde hace muchos siglos atrás, pero ha comenzado a tener importancia a lo largo del siglo XX por la magnitud de las cifras de mortalidad que ocasiona.

La importancia de esta enfermedad radica en su elevada frecuencia en el momento actual y, sobre todo, en la sensación de impotencia que sentimos con algunos tipos de cáncer que pocas veces cuentan con tratamientos efectivos

para su curación, pero que son completamente evitables con medidas preventivas.

### **1.3.1. Importancia del problema del Cáncer**

La importancia real del problema del cáncer se define en todos los países del mundo por dos parámetros:

1. Las cifras de incidencia del cáncer o nuevos casos que aparecen cada año.
2. Las cifras de mortalidad anual por cáncer.

A nivel mundial el cáncer es la segunda causa de muerte en países económicamente desarrollados (después de las enfermedades cardíacas); y la tercera causa de muerte en países en vías de desarrollo (después de las enfermedades del corazón y diarreicas). Una de cada ocho muertes en el mundo es debida al cáncer. Por todo el mundo, el cáncer causa más muertes que el SIDA, la tuberculosis y la malaria combinada. De acuerdo con la Sociedad Americana del Cáncer (ACS)<sup>27</sup> y a la Organización Mundial de la salud 7,6 millones de personas murieron de cáncer en el mundo para el año 2007.<sup>27,28</sup>

A pesar de todos los progresos en el tratamiento del cáncer sorpresivamente la tasa de mortalidad no ha cambiado mucho en los últimos 50 años, y se estima que para el año 2050 en el mundo se presenten 27 millones de casos nuevos y 17,5 millones de muertes por cáncer debido simplemente al crecimiento y envejecimiento de la población.<sup>28</sup>

Los principales tipos de cáncer que contribuyen a la mortalidad general anual son los siguientes:<sup>28</sup>

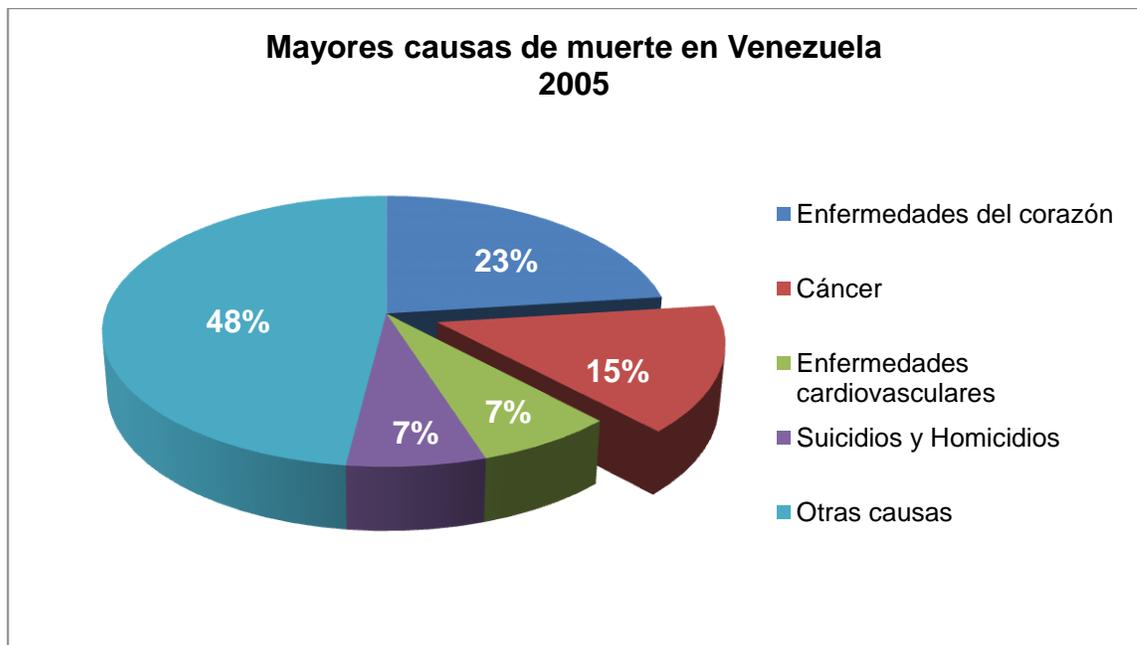
- Pulmón (1,4 millones de defunciones)
- Estómago (866 000 defunciones)
- Hígado (653 000 defunciones)
- Colon (677 000 defunciones)
- Mama (548 999 defunciones)

Aproximadamente el 72% de las defunciones por cáncer ocurridas en 2007 se registraron en países de ingresos bajos y medianos. Se prevee que el número de defunciones anuales mundiales por cáncer seguirá aumentando y llegará a unos 12 millones en 2030.<sup>28</sup>

El envejecimiento es otro factor fundamental en el desarrollo de cáncer. La incidencia de cáncer aumenta espectacularmente con la edad, muy probablemente porque con la edad aumenta la acumulación de factores de riesgo de tipos específicos de cáncer. La acumulación general de factores de riesgo se combina con la tendencia de los mecanismos de reparación celular a perder eficacia con la edad.<sup>28</sup>

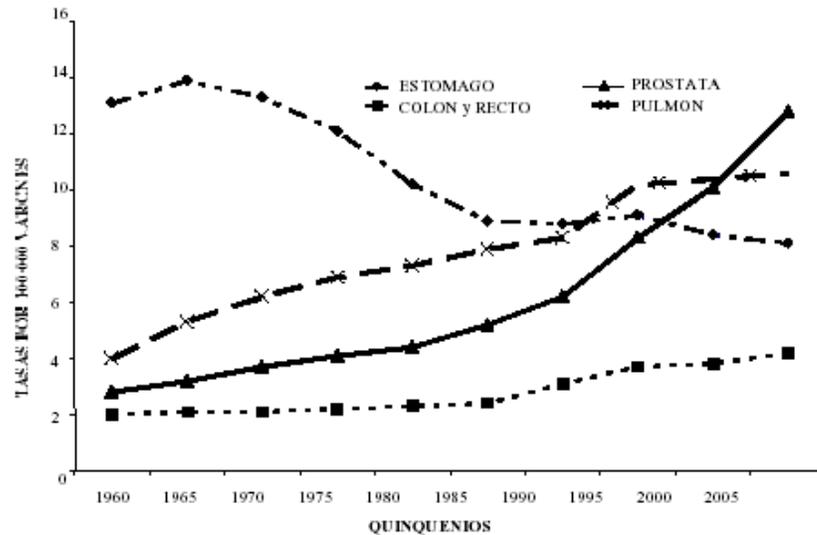
El cáncer cervicouterino causado por VPH es una de las principales causas de defunción por cáncer entre las mujeres en países de bajos ingresos. En los países de ingresos elevados, el consumo de tabaco y alcohol, el exceso de peso y la obesidad son causas muy importantes de cáncer.<sup>28</sup>

En Venezuela, el cáncer constituye una de las más frecuentes causas de morbilidad y mortalidad, hasta tanto que una de cada cuatro personas si alcanza la edad de 74 años, pueden padecer de una de sus variedades y una de cada siete tiene el riesgo de morir por cáncer (**gráfico 1**).<sup>29</sup>



**Gráfico 1.** Las cinco primeras causas de mortalidad en Venezuela.<sup>29</sup>

Las tendencias de la mortalidad para las localizaciones más frecuentes de cáncer en Venezuela desde 1960 al 2005, han sido el cáncer de estómago, colon y recto, próstata y pulmón (**figura 1**).<sup>30</sup>



**Figura 1.** Tendencias de mortalidad por cáncer en Venezuela. 1960-2005.<sup>30</sup>

No todas las localizaciones de cáncer ocurren con la misma frecuencia. Algunas son muy comunes y otras bastante raras. Se presentan además variaciones por género y edad, siendo notablemente diferentes los cánceres de niños, adultos jóvenes o personas de la tercera edad. Según los datos estadísticos publicados en el Anuario Epidemiológico de 2005 (el más actualizado hasta la fecha) y los datos de morbilidad del Registro Central de Cáncer, del Programa de Oncología del Ministerio del Poder Popular para la Salud, el cáncer de próstata es el más frecuente en la población masculina, con una incidencia estimada en 4.408 casos anuales. Lo siguen el de pulmón (1.983 casos) y el de colon y recto (1.006). Estas cuatro localizaciones representan el 56% de la morbilidad o incidencia anual de esta patología.<sup>30</sup>

Respecto a los índices de mortalidad, las primeras posiciones están ocupadas igualmente por las mismas variedades de cáncer, pero llama la atención que la diferencia entre el cáncer de próstata y el de pulmón es muy estrecha (1.710 y 1.799 muertes anuales respectivamente), lo cual contrasta con la morbilidad, pues la incidencia de cáncer de próstata supera ampliamente al de pulmón. Esto se debe a que el primero tiene un porcentaje de curación significativamente más alto que el segundo. En cuanto al género femenino, los cánceres más comúnmente diagnosticados cada año son de cuello uterino (3.685 casos), glándula mamaria (3.549), pulmón (1.202) y colon (1.102), que representan el 57% de la incidencia anual de cáncer en mujeres. De estas cuatro localizaciones, el peor pronóstico lo tiene el cáncer de pulmón, aun cuando es el más prevenible y sería en pocas décadas una rareza si se controlara el hábito de fumar. Las otras tres localizaciones ofrecen la probabilidad de un buen pronóstico, cuando se diagnostican precozmente y se aplican las modalidades de tratamiento más apropiadas. En lo referente a la mortalidad por cáncer en féminas, se repiten las tres primeras localizaciones con 1.602, 1.449 y 1.036 muertes anuales respectivamente, pero el cuarto lugar sigue ocupado por el cáncer de estómago (698 muertes por año), que ha estado disminuyendo su frecuencia en las últimas tres décadas, gracias a los cambios favorables en el tipo de alimentación de la población, al aumento del consumo de vegetales, frutas y derivados lácteos, y a la disminución del consumo de carnes y pescados salados.<sup>29,30</sup>

La disposición de amplios conocimientos acerca de las causas de cáncer hace posible prevenir aproximadamente el 30% de los casos de cáncer mediante la modificación o la prevención de los principales factores de riesgo.<sup>28</sup>

Por las características de evolución y desarrollo, el cáncer reviste una gran complejidad, tanto en el orden médico por las implicaciones en tecnología de diagnóstico y tratamiento; como en el psicosocial, por la carga emocional y económica que representa.

A pesar de sus dificultades y complejidades, es la enfermedad crónica con mejor pronóstico hoy día.

### **1.3.2. Aspectos generales del cáncer**

#### **1.3.2.1. ¿Qué es el cáncer?**

El cáncer es un grupo de enfermedades caracterizado por la proliferación descontrolada de células anormales con capacidad de propagarse por el cuerpo; a través de dos mecanismos: invasión y metástasis. La invasión es la migración y penetración directa por las células del cáncer en los tejidos vecinos. La metástasis es la capacidad de las células del cáncer de penetrar en los vasos sanguíneos y linfáticos, circular a través del torrente sanguíneo, y después crecer en un nuevo foco en tejidos normales de otra parte del cuerpo.<sup>31</sup>

Las células cancerosas se diferencian de las células normales por cuatro características. En primer lugar, la autonomía, ya que estas células han

escapado del control que, en condiciones normales, rige el crecimiento celular. La segunda característica es la capacidad para clonarse, ya que el cáncer se origina de una única célula progenitora, en la que ha habido un cambio genético, que prolifera y da lugar a un clon de células malignas (todas las células son idénticas). Las otras dos características restantes son la anaplasia (falta de diferenciación tanto morfológica como funcional) y la metástasis.<sup>31</sup>

Casi todos los cánceres forman bultos o masas de tejido que reciben el nombre de tumores, pero no todos los tumores son cancerosos o malignos. Los tumores benignos se caracterizan por un crecimiento lento, localizado y bien diferenciado o semejante a las células normales maduras del tejido de origen, mientras que, los tumores malignos son de crecimiento errático y puede ser de lento a rápido, metástasicos y poco diferenciados.<sup>31</sup>

El cáncer puede originarse casi en cualquier parte del cuerpo.<sup>31</sup>

- **Los carcinomas**, los tipos más comunes de cáncer, se originan de las células que cubren las superficies externas e internas del cuerpo. Los cánceres de pulmón, de seno (mama) y de colon son los cánceres más frecuentes de este tipo en los Estados Unidos.
- **Los sarcomas** son cánceres que se originan de células que se encuentran en los tejidos de soporte del cuerpo, como por ejemplo, hueso, cartílago, grasa, tejido conectivo y músculo.
- **Los linfomas** son cánceres que se originan en los ganglios linfáticos y en los tejidos del sistema inmunológico del cuerpo.

- **Las leucemias** son cánceres de las células inmaduras de la sangre que crecen en la médula ósea y que tienen la tendencia a acumularse en grandes cantidades en el torrente sanguíneo.

La biología del cáncer puede dividirse en cuatro fases: 1) cambio maligno en la célula diana, denominado transformación; 2) crecimiento de las células transformadas; 3) invasión local y 4) metástasis a distancia.<sup>31</sup>

Todos los cánceres se originan en células normales, las cuales, son las unidades básicas que forman los tejidos del cuerpo. Para que una célula normal cambie su fenotipo y se convierta en una célula neoplásica, se requieren varias mutaciones en varios genes. Las siete alteraciones esenciales para la transformación maligna de una célula normal, son:<sup>31</sup>

1. Autosuficiencia en las señales de crecimiento: los tumores tienen la capacidad de proliferar sin estímulo externo, habitualmente como consecuencia de la activación del oncogén (es un gen anormal que procede de la mutación de un gen normal llamado protooncogen).
2. Falta de sensibilidad a las señales inhibitoras de crecimiento: los tumores pueden no responder a las moléculas inhibitoras de la proliferación de células anormales.
3. Evasión de la apoptosis: los tumores pueden ser resistentes a la muerte celular programada.

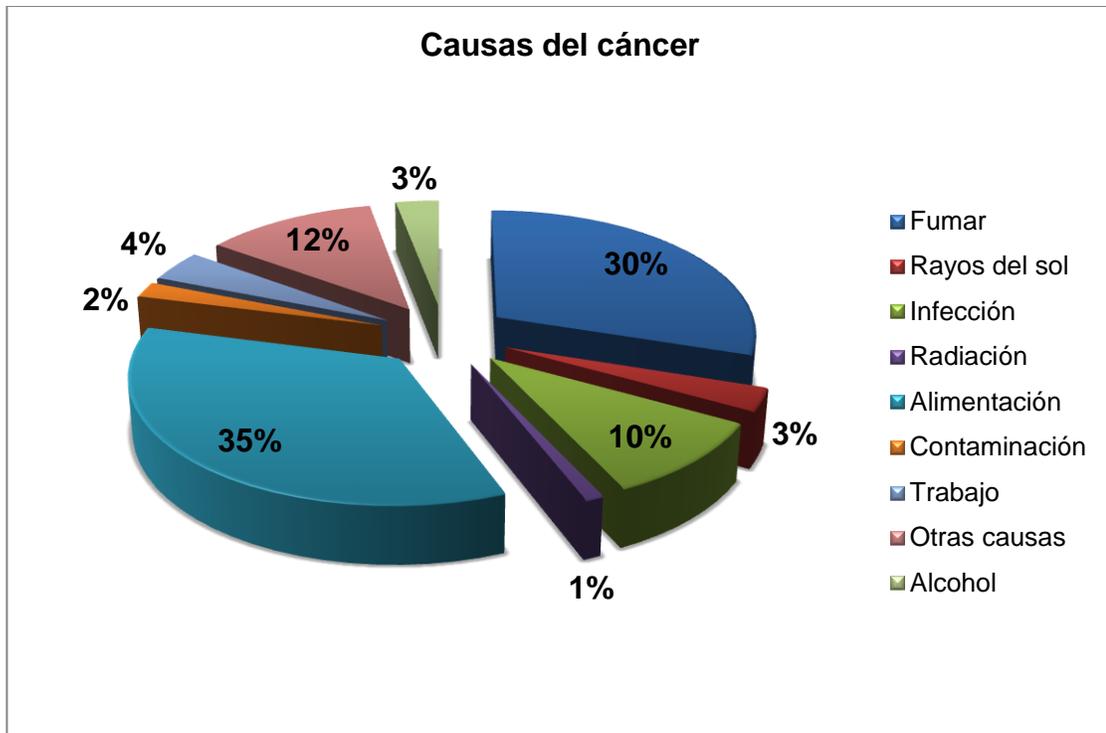
4. Defectos en la reparación del ADN: los tumores pueden dejar de reparar el daño en el ADN producido por carcinógenos o proliferación celular no regulada.
5. Potencial replicativo ilimitado: las células tumorales tienen una capacidad proliferativa ilimitada, asociada con el mantenimiento de la longitud y función de los telómeros (se encuentran en los extremos de los cromosomas, cuya función principal es la estabilidad estructural de los cromosomas, la división celular y el tiempo de vida de las estirpes celulares).
6. Angiogénesis mantenida: los tumores no son capaces de crecer sin la formación de un aporte vascular que está inducido por diversos factores, siendo el más importante el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF).
7. Capacidad de invadir y metastatizar: las metástasis tumorales son la causa de la inmensa mayoría de las muertes por cáncer y dependen de procesos intrínsecos de la célula o que se inician por señales del ambiente tisular.

#### **1.3.2.2. Causas del Cáncer**

*William Richard ShaboeDoll*(1912– 2004)Médico Epidemiólogo Británico, fumador desde los 13 años de edad, fue el primero en relacionar tabaquismo con el cáncer de pulmón. Constató que el cáncer es una combinación de la naturaleza, el estilo de vida y el azar.

Las alteraciones genéticas presentes en el cáncer, pueden ser causadas por factores externos, como el tabaco, químicos (benceno, compuestos policlorados contenidos en insecticidas y pesticidas) radiación e infecciones virales (Virus del Papiloma Humano se asocia con el carcinoma de cervix, Epstein-Barr con el linfoma de Burkitt y los linfoepiteliomas, Hepatitis B y C con el hepatocarcinoma) y factores internos, como mutaciones heredadas, hormonas, condiciones inmunes y las mutaciones que ocurren en el metabolismo.<sup>28</sup>

Hoy día se calcula que menos del 20% de los cánceres son de causa hereditaria, y los factores ambientales son la causa del 80% de los cánceres. La relación causa efecto más demostrada es el humo de tabaco, inhalado de forma activa o pasiva; es responsable de cerca del 30% de las muertes por cáncer. Los factores alimentarios pueden ser responsables de un 35%, pero la relación causal no está tan establecida, y no se conocen con exactitud los constituyentes de la dieta que son responsables. La obesidad es un factor de riesgo para algunos cánceres como el cáncer de mama, colon, útero y próstata. El alto contenido en grasas y el pobre contenido en fibra de la dieta se asocian con una alta incidencia de cáncer de colon. Al igual que ocurre con el alcohol, las grasas y la obesidad parecen actuar como promotores (**gráfico 2**).<sup>28</sup>



**Gráfico 2.** Causas del Cáncer. <sup>28</sup>

### 1.3.2.3. Ciclo celular

El entendimiento del ciclo celular y el control del crecimiento celular normal y maligno son cruciales para el diseño de los regímenes terapéuticos actuales y la búsqueda de nuevos agentes antineoplásicos.

Las células normales crecen y se multiplican mediante un proceso de división celular controlado, que es parte del ciclo celular, en el cual una célula madre se divide en dos células hijas. La incorrecta regulación del ciclo celular puede conducir a la aparición de células cancerígenas que, si no son inducidas al suicidio mediante apoptosis, puede dar lugar a la aparición de cáncer.<sup>31</sup>

El ciclo celular en una célula normal es un proceso ordenado y repetitivo en el tiempo mediante el cual una célula madre crece, reemplaza y repara los tejidos dañados y se divide; las células que no se están dividiendo se encuentran en una fase de reposo o inactividad conocida como  $G_0$ , y se conocen como células quiescentes (**figura 2**).<sup>31</sup>

El ciclo celular se divide en dos fases.<sup>31</sup>

1. **Interfase** (estado de no división celular). Esta fase comprende tres etapas:

- Fase G1 (Gap 1): Es la primera fase del ciclo celular, en la que existe un aumento del tamaño celular con síntesis de proteínas y de ARN. En este tiempo la célula duplica su tamaño y masa debido a la continua síntesis de todos los componentes necesarios para la duplicación, como resultado de la expresión de los genes que codifican las proteínas responsables de su fenotipo particular.
- Fase S: Es la segunda fase del ciclo, en la que se produce la replicación o síntesis del ADN, mediante la acción de varias enzimas: la helicasa separa las dos hebras de ADN; las topoisomerasas I y II cortan sectores de la cadena para facilitar el desenrollamiento; las polimerasas, actúan como “copiadoras”, encargándose de la síntesis y adición de nucleótidos; luego, vuelve a producirse el enrollamiento de la doble cadena pero desde ese momento, el material genómico es duplicado, denominándose cromátide, cada una de las copias, siendo idénticas en el material genético que contienen. Con la

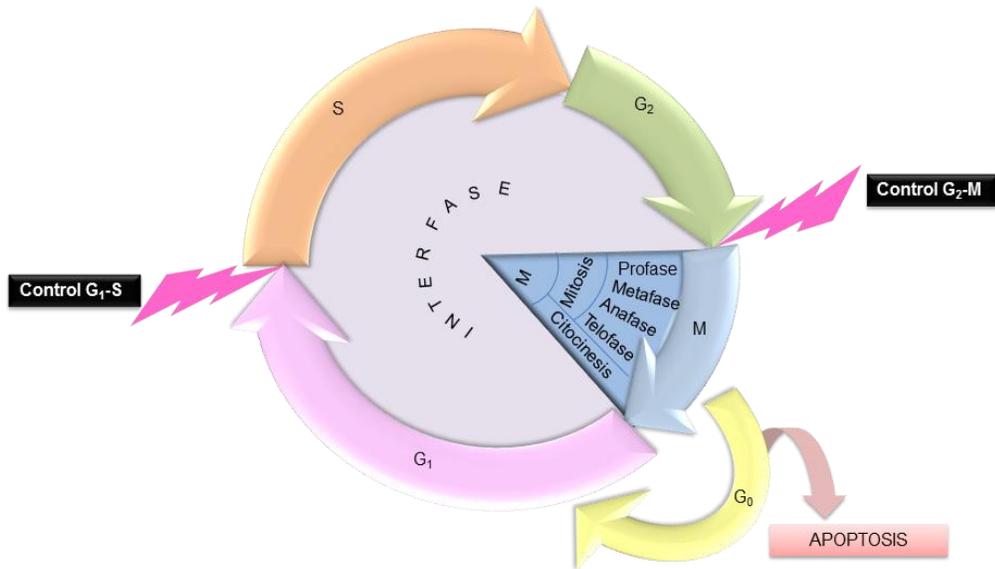
duplicación del ADN, el núcleo contiene el doble de proteínas nucleares y de ADN que al principio.

- Fase G2 (Gap 2): Es la tercera fase de crecimiento del ciclo celular en la que continúa la síntesis de proteínas y ARN, y la célula se prepara para la mitosis. Al final de este período se observa cambios en la estructura celular, que indican el principio de la división celular. Termina cuando la cromatina empieza a condensarse al inicio de la mitosis.

2. **Fase M** (estado de división celular). Es la división celular donde se produce el reordenamiento genético y la separación en dos células hijas idénticas. Esta fase incluye la Mitosis en la cual ocurre el reparto de material genético nuclear, a su vez dividida en: profase, metafase, anafase y telofase; y la Citocinesis que comprende la división del citoplasma, que se inicia ya en la telofase mitótica.

- Profase: La cromatina en el núcleo comienza a condensarse y se vuelve visible como cromosomas. El nucléolo desaparece. Los centríolos comienzan a moverse a polos opuestos de la célula y las fibras se extienden desde los centrómeros. Algunas fibras cruzan la célula para formar el huso mitótico. La membrana nuclear se disuelve. Las proteínas se adhieren a los centrómeros creando los cinetocoros. Los microtúbulos se adhieren a los cinetocoros y los cromosomas comienzan a moverse.

- **Metafase:** Fibras del huso alinean los cromosomas a lo largo del medio del núcleo celular. Esta línea es referida como, el plato de la metafase. Esta organización ayuda a asegurar que en la próxima fase, cuando los cromosomas se separan, cada nuevo núcleo recibirá una copia de cada cromosoma.
- **Anafase:** Los pares de cromosomas se separan en los cinetocoros y se mueven a lados opuestos de la célula. El movimiento es el resultado de una combinación del movimiento del cinetocoro a lo largo de los microtúbulos del huso y la interacción física de los microtúbulos polares.
- **Telofase:** Los cromatidos llegan a los polos opuestos de la célula, y nuevas membranas se forman alrededor de los núcleos hijos. Los cromosomas se dispersan. Las fibras del huso se dispersan, y la citocinesis o la partición de la célula puede comenzar también durante esta etapa.
- **Citocinesis:** En células animales, la citocinesis ocurre cuando un anillo fibroso compuesto de una proteína llamada actina, alrededor del centro de la célula se contrae dividiendo la célula en dos células hijas, cada una con su núcleo. En células vegetales, la pared rígida requiere que una placa celular sea sintetizada entre las dos células hijas.



**Figura 2.** Ciclo celular.

El destino de las células hijas puede ser: a) reingresar hacia una nueva división celular; b) progresar hacia la diferenciación y luego muerte por el proceso de apoptosis celular; c) quedar en estado “quiescente” o G<sub>0</sub> por tiempo indeterminado para luego reinsertarse en alguna de las dos rutas anteriormente señaladas.<sup>31</sup>

La progresión ordenada de las células a través de las diversas fases del ciclo celular está orquestada por las proteínas ciclinas, las enzimas cinasas dependientes de ciclina (CDK), que trabajan regulando el ciclo positivamente, y por sus inhibidores.<sup>31</sup>

Existen varios tipos de ciclinas, que se distinguen según el momento del ciclo donde actúan. La actividad de las CDK está regulada por las ciclinas y dirigen el

ciclo celular por la fosforilación de proteínas dianas críticas que se requieren para la progresión de las células a las siguientes fases del ciclo.<sup>31</sup>

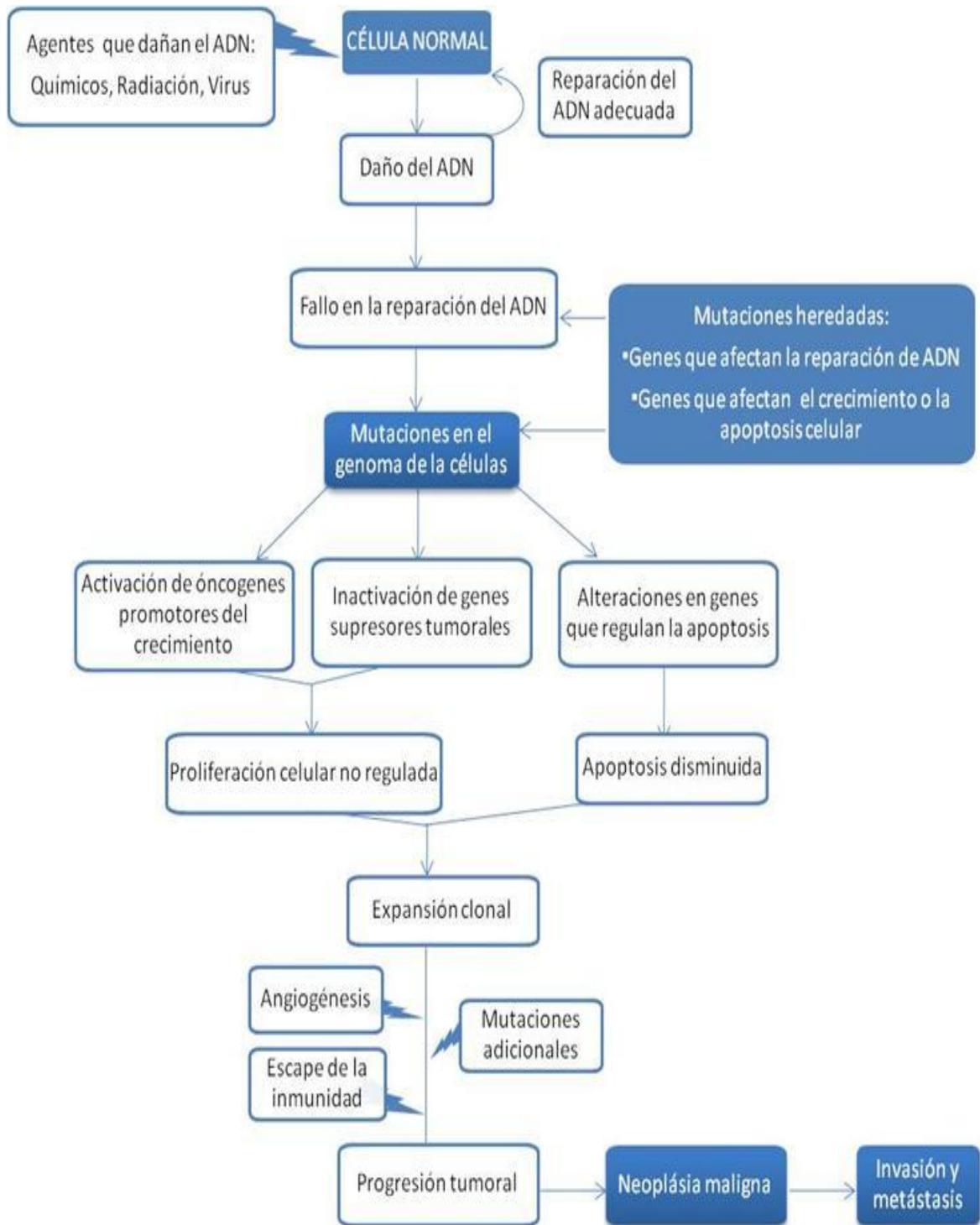
La actividad de los complejos ciclina-CDK, está estrechamente regulada por los inhibidores, denominados inhibidores de CDK. Estos inhibidores funcionan como supresores tumorales y están frecuentemente alterados en los tumores, como es el caso del gen p53 que activa puntos de control, retrasando o parando la progresión en el ciclo celular de la célula dañada o produce la apoptosis.<sup>31</sup>

Estos sistemas de regulación comprenden lo que se llama los puntos de control del ciclo celular. Existen dos puntos de control principales, uno en la región G<sub>1</sub>-S (iniciación de la replicación) y otro en G<sub>2</sub>-M (iniciación de la mitosis).<sup>31</sup>

Se ha sugerido que las células cancerosas presentan mutaciones que inducen inestabilidad genómica y, por lo tanto, aceleran la tasa de mutaciones del genoma. Algunas de estas mutaciones afectan a genes que codifican para componentes de los mecanismos de control del ciclo celular (puntos de control), los cuales determinan el orden de los eventos en dicho ciclo, así como la fidelidad e integridad de los sistemas de replicación y reparación del ADN.<sup>32</sup> Aunque no está claro cuál es el origen génico de muchas enfermedades, éstas se caracterizan por un aumento en la sensibilidad ante agentes que dañan al ADN, una alta frecuencia de rearrreglos génicos aberrantes y una alta predisposición al desarrollo de cáncer.<sup>31</sup>

En la mayoría de los casos, la interrupción de la proliferación celular ocurre cuando la integridad del genoma ha sido comprometida. Alteraciones en el proceso de interrupción del ciclo celular permiten que células con genomas inestables evolucionen a células cancerosas.<sup>33</sup>

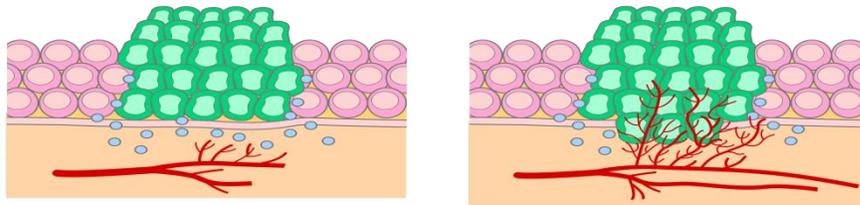
Se cree que muchos tumores son el resultado de una multitud de pasos, de los que una alteración mutagénica no reparada del ADN podría ser el primer paso. Las alteraciones resultantes hacen que las células inicien un proceso de proliferación descontrolada e invadan tejidos normales. El desarrollo de un tumor maligno requiere de muchas transformaciones genéticas. La alteración genética progresa, reduciendo cada vez más la capacidad de respuesta de las células al mecanismo normal regulador del ciclo.<sup>34</sup>



**Figura 3.** Síntesis de las bases moleculares del cáncer.<sup>34</sup>

Por otro lado, a través del entendimiento de la morfología del cáncer, se ha descubierto que uno de los eventos fundamentales requeridos para que se desarrolle la metástasis es el crecimiento de una nueva red de vasos sanguíneos. Este proceso de formación de nuevos vasos sanguíneos se conoce como *angiogénesis* (**figura 4**). En gran medida, es esta habilidad, de diseminarse a otros tejidos y órganos, lo que hace que el cáncer sea una enfermedad que potencialmente pone en peligro la vida, por ello hoy día existe un creciente interés por parte de la comunidad científica en entender este proceso para el desarrollo de nuevos fármacos.<sup>27,28</sup>

Las paredes de los vasos sanguíneos están formadas por *células vasculares endoteliales*. Estas células raramente se dividen. Sin embargo, cuando la situación así lo requiere, la angiogénesis puede estimularlas para que se dividan.<sup>27</sup>

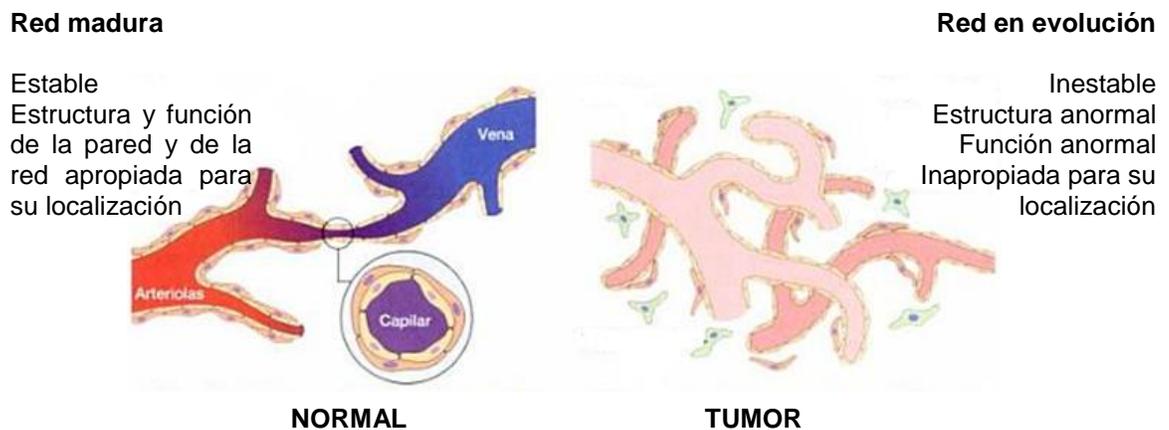


**Figura 4.** La angiogénesis del tumor.<sup>27</sup>

Antes de los años 1960, los investigadores del cáncer creían que el suministro de sangre alcanzaba a los tumores simplemente debido a que los vasos sanguíneos pre-existentes se dilataban. Pero experimentos posteriores

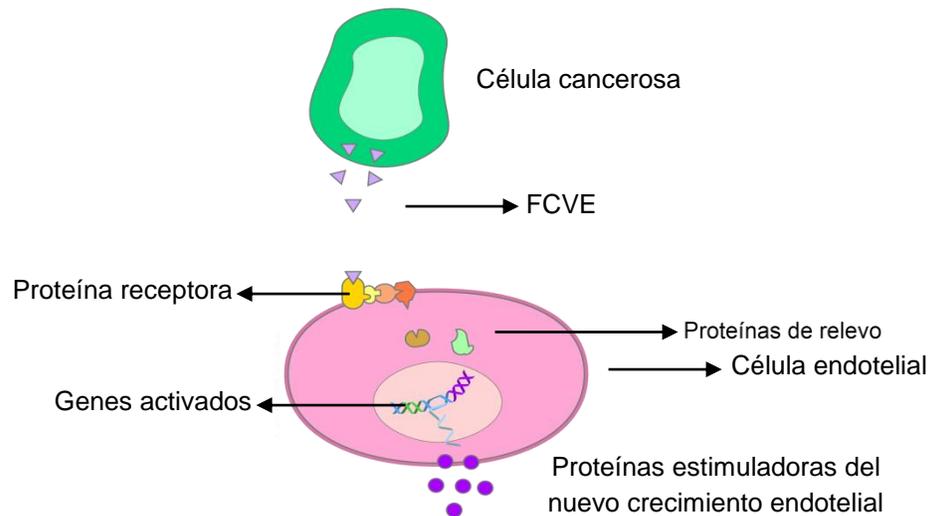
mostraron que la angiogénesis es esencial para suministro de nutrientes al tumor canceroso, y así éste continúe creciendo y diseminándose.<sup>27</sup>

Actualmente, se conoce que las células tumorales tienen la capacidad de estimular la formación de nuevos vasos sanguíneos, que difieren de la vasculatura normal porque son de forma irregular y permeables (**figura 5**), por medio de la secreción de factores de crecimiento angiogénicos, entre estas moléculas dos proteínas parecen ser las más importantes para sustentar el crecimiento del tumor: factor de crecimiento vascular endotelial (FCVE) (*vascular endothelial growth factor* o *VEGF*, en inglés), al cual se le atribuye la permeabilidad de los vasos neoformados, y factor básico de crecimiento de fibroblastos (FBCF) (*basic fibroblast growth factor* o *bFGF*, en inglés). El factor FCVE y el factor FBCF son producidos por muchos tipos de células cancerosas y por ciertos tipos de células normales también.<sup>27</sup>



**Figura 5.** Vascularización tumoral.<sup>27</sup>

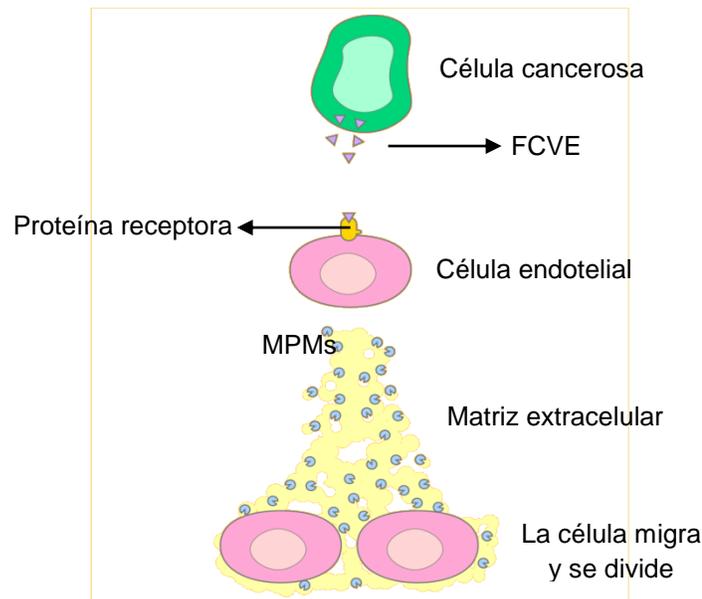
Los factores de crecimiento FCVE y FBCF son sintetizados primero dentro de las células tumorales y después secretadas en el tejido vecino. Luego ellos se unen a proteínas específicas, conocidas como receptoras, localizadas en la superficie exterior de las células endoteliales. La unión de alguno de los dos factores de crecimiento FCVE o FBCF a su receptor apropiado activa una serie de proteínas de relevo que transmiten una señal provocando que un grupo de genes produzcan los productos necesarios para estimular la proliferación celular endotelial y organización en nuevos capilares (**figura 6**).



**Figura 6.** Cascada señalizadora de la angiogénesis.<sup>27</sup>

La activación de células endoteliales por los juegos de factores FCVE o FBCF pone en marcha una serie de pasos hacia la creación de nuevos vasos sanguíneos. Primero, las células endoteliales activadas producen metaloproteinasas de la matriz o MPMs (matrix metalloproteinases o MMPs, en

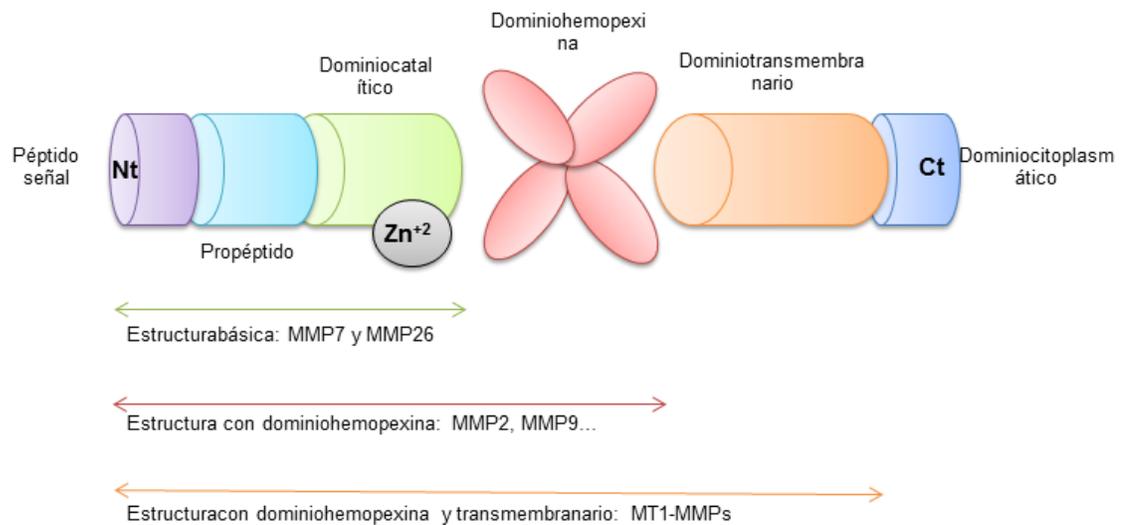
inglés), una familia de enzimas líticas de la matriz extracelular (MEC) que son endopeptidasas dependientes de zinc. Estas enzimas se liberan de las células endoteliales al tejido vecino. Las MPMs degradan la *matriz extracelular*; el material de apoyo que llena los espacios entre las células y que está compuesto por muchos componentes distintos interconectados que se pueden clasificar en tres grandes grupos: proteoglicanos y glucosaminoglicanos, proteínas estructurales (como el colágeno y la elastina), y proteínas de adhesión (como la fibronectina y la laminina). La degradación de esta matriz permite la migración de las células endoteliales. A medida que ellas migran a los tejidos vecinos, las células endoteliales activadas empiezan a dividirse. Pronto ellas se organizan en tubos huecos que evolucionan gradualmente y se convierten en una red madura de vasos sanguíneos (**figura 7**).<sup>27</sup>



**Figura 7.** Activación endotelial celular.<sup>27</sup>

Se han descrito 24 genes distintos que codifican diferentes MMPs; éstas se clasificaron en un primer momento en función de la especificidad del sustrato (colagenasas, gelatinasas, estromelinas y matrilisinas), pero actualmente se clasifican en función de la estructura de la enzima. La estructura básica de las MMPs presenta una serie de dominios característicos: un péptido señal que dirige la secreción al exterior de la célula, un propéptido que mantiene a la enzima inactiva hasta que sufre un corte proteolítico y un dominio catalítico carboxiterminal que une zinc (**figura 8**).<sup>27,28</sup>

Sobre esta estructura básica aparecen diversas variantes, como un dominio de tipo hemopexina que media en la especificidad del sustrato y las interacciones con inhibidores endógenos, o un dominio transmembranario en el caso de las MMPs asociadas a la membrana plasmática. Así, en la clasificación estructural se distinguen ocho grupos: cinco grupos de MMPs secretadas y tres de MMPs asociadas a la membrana (MT-MMP).<sup>27,28</sup>



**Figura 8.** Estructura básica de las MMP.

Las MMPs se sintetizan como zimógenos (inactivas) y es necesario activarlas con un corte proteolítico en el propéptido del dominio aminoterminal. El proceso de activación de las proMMP varía según la enzima, pero suelen intervenir otras proteasas, como el activador de plasminógeno del tipo urocinasa (uPA) y las propias MMPs.<sup>27,28</sup>

Como contrapartida a la actividad de las MMPs, existen muchas moléculas endógenas capaces de inhibir su acción: los inhibidores hísticos de las metaloproteinasas (TIMP) y los inhibidores plasmáticos, como la macroglobulina  $\alpha_2$ . Además, las MMP están reguladas también tanto transcripcional como post-transcripcionalmente (estabilización del mRNA, glucosilaciones...), y su transcripción se induce en respuesta a las citocinas, los factores de crecimiento, los agentes químicos, el estrés físico, los oncogenes activados y las interacciones con la MEC. Con estas herramientas se ejerce una fina regulación de la actividad de las MMPs y su acción se restringe a determinados procesos fisiológicos como el desarrollo embrionario, procesos reproductivos y la remodelación de los tejidos. Por el contrario, muchos estados patológicos están asociados a una desregulación de las MMPs, entre ellos el cáncer.<sup>27,28</sup>

En el cáncer, además de por razones estructurales relacionadas con el crecimiento de la masa tumoral y la invasión de los tejidos, la acción degradativa de las MMPs sobre la MEC es muy importante porque es capaz de alterar las uniones célula-MEC y célula-célula, mediar la liberación, activación o desactivación de moléculas señalizadoras autocrinas o paracrinas (activadores de angiogénesis, por ejemplo) y activar o inactivar los receptores de la

superficie celular. En general, lo que hacen las MMPs es crear un ambiente favorable para el desarrollo de un tumor, un microambiente que promueve la malignización.<sup>27,28</sup>

Aunque muchos tumores producen moléculas angiogénicas, tales como; los factores FCVE y FBCF, su presencia no es suficiente para iniciar el crecimiento de vasos sanguíneos. Para que la angiogénesis empiece, estas moléculas activadoras deben superar una variedad de inhibidores de la angiogénesis que normalmente reprimen el crecimiento de los vasos sanguíneos.<sup>27,28</sup>

Casi una docena de proteínas que existen naturalmente pueden inhibir la angiogénesis. Entre este grupo de moléculas, las proteínas conocidas como *angiostatina*, *endostatina* y *trombospondina* parecen ser especialmente importantes. Un balance finamente armonizado entre las concentraciones de inhibidores y de activadores de la angiogénesis tales como los factores de crecimiento FCVE y FBCF determina si un tumor puede inducir el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos. Para activar la angiogénesis, la producción de activadores se debe incrementar a medida que la producción de inhibidores disminuye.<sup>27,28</sup>

El descubrimiento de este proceso plantea la posibilidad de retardar o prevenir el crecimiento y diseminación de las células cancerosas como una nueva estrategia terapéutica por medio de la inhibición de la angiogénesis.<sup>27,28</sup>

### 1.3.3. Tratamiento

El arsenal terapéutico disponible para el tratamiento de esta enfermedad es muy variado, y su uso depende del tipo específico, localización y estado del cáncer. Entre las técnicas disponibles para el tratamiento del cáncer, se encuentran; cirugía, terapia de radiación, tratamiento inmunológico y quimioterapia.<sup>35</sup>

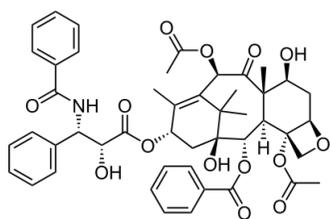
Los agentes quimioterapéuticos del cáncer son usados con un amplio rango de propósitos, ya sea; para curar un tipo específico de cáncer, reducir el tamaño de un tumor antes de la cirugía, sensibilizar los tumores a la terapia de radiación o para destruir metástasis microscópicas después que los tumores son removidos quirúrgicamente.<sup>35</sup>

Los fármacos utilizados actualmente en la quimioterapia del cáncer caen dentro de varias categorías según su mecanismo de acción, que tienen en común la capacidad de ocasionar una alteración del ciclo celular, provocando la muerte celular por disminución de la capacidad de proliferación, entre los que se encuentran.<sup>35</sup>

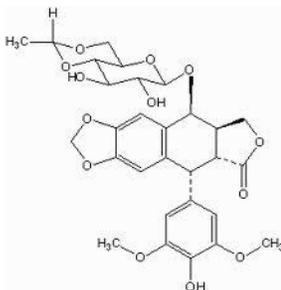
- Agentes alquilantes.
  - Mostazas nitrogenadas: mecloroetamina, ciclofosfamida **5**, ifosfamida. melfalan, clorambucilo.
  - Etileneiminas y metilmelaminas: altretamina, tiotepa.
  - Derivados metilhidrazinas: procarbazona.
  - Alquilsulfonatos: busulfan.

- Nitrosoureas: carmustina **6**, estreptozotocina.
- Triazenos: dacarbazina.
- Complejos de coordinación con platino: cisplatino, carboplatino, oxiplatino.
- Antibióticos: mitomicina C.
- Otros: hidroxiaurea.
- Antimetabolitos.
  - Análogos de ácido fólico: metotrexato **7**, pemetrexed.
  - Análogos de pirimidinas: fluorouracilo **8**, citarabina, gemcitabina.
  - Análogos de purina e inhibidores relacionados: mercaptopurina **9**, pentostatina.
- Antimitóticos.
  - Alcaloides de la Vinca: vinblastina, vinorelbina, vincristina **10**,
  - Taxanos: paclitaxel **11**, docetaxel
- Intercaladores del ADN e inhibidores de las topoisomerasas I y II.
  - Etoposídeos: etopósido **12**, tenipósido.
  - Camptotecinas: topotecan, irinotecan.
  - Antibióticos antraciclina: danorubicina, doxorubicina.
  - Antracendiona: mitroxantrona.
- Inhibidores de las funciones de proteínas y aminoácidos
  - Enzimas: L-asparaginasa
- Creadores de radicales libres: bleomicina
- Inhibidores de Tirosinasa: imatinib, gefitinib, erlotinib, sunitinib **13**.

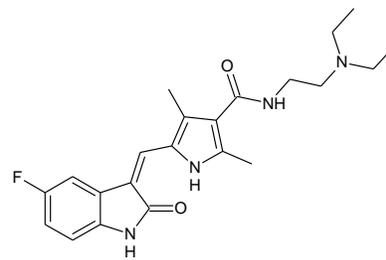




**11**



**12**



**13**

Sin embargo, estos agentes son útiles contra tumores pequeños, ya que, los tumores grandes no están bien perfundidos, lo que hace que estos agentes no lleguen al interior del tumor. Un segundo problema con la quimioterapia del cáncer es su carencia de selectividad entre las células normales y malignas. Su utilidad en el tratamiento del cáncer depende de la hipótesis que las células malignas, las cuales son células de proliferación acelerada, toman material extracelular a velocidades más grandes que las células normales.<sup>35</sup> Este efecto no selectivo es el responsable de la toxicidad sobre los tejidos del organismo que se encuentran en rápido crecimiento. Y tercero, pero no menos importante, son los mecanismos de resistencia por parte de las células tumorales a los tratamientos establecidos. Entre los mecanismos de resistencia más habituales hay que destacar la disminución en la captación de los citotóxicos o en la actividad de los profármacos, modificaciones en los mecanismos de reparación celular y el aumento de la capacidad de expulsión de los citotóxicos.<sup>35</sup>

El éxito del tratamiento del cáncer se atribuye a una variedad de factores que incluyen mejores métodos de detección y tratamiento.<sup>35</sup>

Uno de los mayores retos de la química medicinal actual consiste en el desarrollo de nuevos fármacos citotóxicos que ejerzan un mayor efecto sobre las células cancerosas que sobre las células normales y con mínimos efectos adversos.

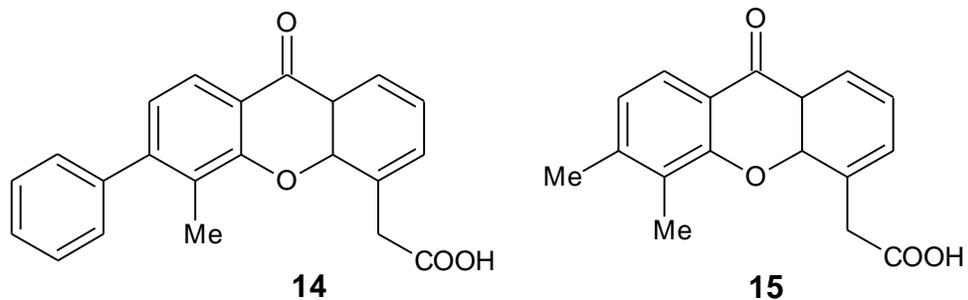
#### **1.3.3.1. Nuevas estrategias terapéuticas**

En la actualidad el desarrollo de nuevos fármacos citotóxicos se continúa enfocando hacia la inhibición de dianas específicas del ciclo celular; y la inhibición de la angiogénesis del tumor, siendo esta última uno de los blancos terapéuticos más estudiados en este momento para atacar el tumor indirectamente.

Los desarrollos clínicos de la terapia antiangiogénica para el cáncer están avanzando rápidamente. Para el inicio del año 2000 más de 40 inhibidores entraron en ensayos clínicos, con más de una docena en estudios Fase III.<sup>27,28</sup>

Los blancos farmacológicos de los vasos sanguíneos del tumor se pueden dividir en dos categorías: 1) los verdaderos inhibidores de la angiogénesis o antiangiogénicos, diseñados para impedir el proceso de neovascularización del tumor, bloqueando la formación de nuevos vasos sanguíneos y el crecimiento del tumor; y 2) los agentes blancos de la vascularización o antivascuales, diseñados para destruir la vascularización preexistente del tumor.<sup>36</sup> Hay dos tipos de agentes antivascuales también llamados Agentes Interruptores de la Vascularización (VDAs, también conocidos como agentes blancos de la vascularización, VTAs), ligando-dirigido (p. ej. Anticuerpos, péptidos) y

moléculas pequeñas. Hay dos clases de moléculas pequeñas; la primera clase son los Flavonoides sintéticos (p.ej. FAA **14**, DMXAA **15**) que actúan a través de la inducción de una citocina local (factor alfa de necrosis tumoral, TNF $\alpha$ ), y la segunda clase son los agentes inhibidores de la tubulina (p.ej. taxol, colchicina, combretastatinas).<sup>38, 37</sup>

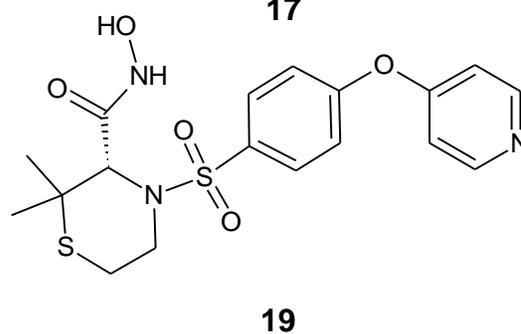
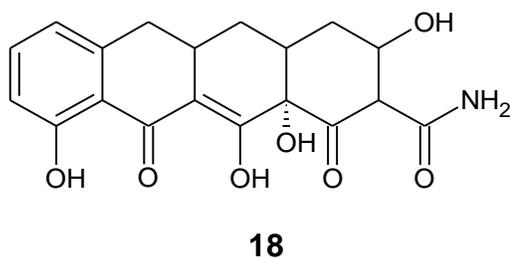
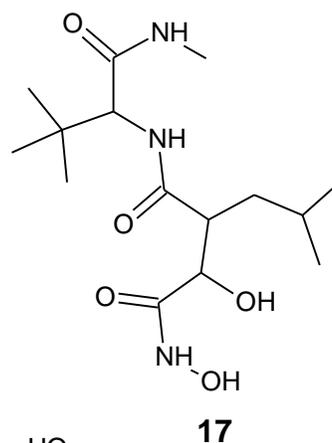
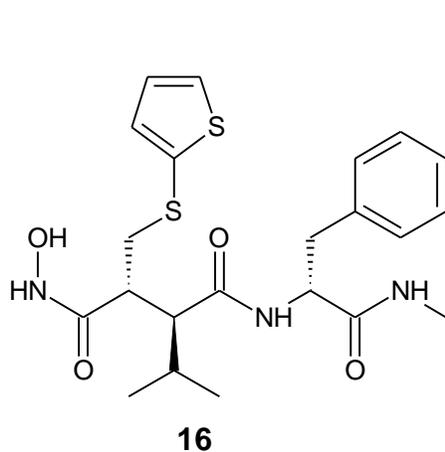


La elucidación de pasos discretos en la cascada angiogénica ha permitido el desarrollo racional de medicamentos antiangiogénicos.

Los medicamentos actuales en ensayos clínicos exploran varias estrategias dirigidas a la angiogénesis de los vasos sanguíneos. Entre ellas se puede mencionar:<sup>36</sup>

- Los antagonistas del factor de crecimiento
- Inhibidores de la transducción de señales de las células endoteliales
- Inhibidores de la proliferación celular endotelial
- Inhibidores de la Matriz de Metaloproteinasas
- Blancos del marcador de superficie endotelial
- Supresión de las células endoteliales progenitoras

Como ya se comentó anteriormente, la matriz de metaloproteínas son enzimas que juegan un papel importante en la patogénesis del cáncer. En consecuencia, los inhibidores de MMP representan un blanco atractivo para una nueva clase de agentes contra el cáncer. El batimastat **16** y marimastat **17** son inhibidores potentes de amplio espectro de la mayoría MMPs y se han demostrado prevenir o reducir la propagación y el crecimiento de diferentes tumores malignos en numerosos modelos animales. Ambos agentes están ahora en pruebas clínicas avanzadas en un número de diferentes tumores sólidos en América del Norte y Europa. Otros ejemplos de estos agentes en ensayos clínicos incluyen el metastat **18** y prinomastat **19**.<sup>38,37</sup>



Los estudios sobre el uso de moléculas pequeñas como inhibidores de la MMPs en la etapa temprana de la enfermedad aporta pruebas de que estos fármacos

son de utilidad para tratar y prevenir la metástasis. De esta manera, existe la posibilidad de un nuevo enfoque para el tratamiento del cáncer además de la terapia citotóxica tradicional.<sup>36</sup>

Tomando en consideración la importancia de los eventos relacionados con el proceso de angiogénesis tumoral, en este trabajo se utilizó como una estrategia para el desarrollo de nuevos fármacos la identificación de compuestos dirigidos hacia la inhibición de la MMPs,

#### **1.4. Enfermedad de Chagas**

"Nunca hemos tenido un arsenal de sofisticadas tecnologías para el tratamiento de enfermedades, sin embargo, el vacío en los resultados de salud sigue aumentando. Esto es inaceptable." Este reclamo fue hecho por el Director General de la World Health Organization (WHO), Margaret Chan, en el 2007.

Hoy día, las enfermedades tropicales desatendidas (neglected tropical diseases (NTDs) afectan a más de un billón de personas (un sexto de la población mundial), causando 550000 muertes anualmente, además de ser la consecuencia de discapacidades graves y permanentes que dificultan el desarrollo humano y el resultado de importantes pérdidas socioeconómicas. Sorpresivamente, el descubrimiento de fármacos para las NTDs es una tubería casi seca. Los bajos rendimientos de las inversiones han desalentado las compañías farmacéuticas a invertir en proyectos de investigación dedicados al descubrimiento de nuevos fármacos candidatos para NTDs. A nivel académico, las publicaciones en lugar de ser una buena contribución a la práctica social

actualmente son premiadas. Por otra parte, las instituciones académicas son algunas veces ingenuas acerca de lo que se necesita para desarrollar un medicamento, y mucho más básica la investigación es entonces, inutilizable. Sin embargo, durante la última década la brecha ha comenzado a cerrarse en el campo de NTDs, debido a la aparición de una serie de asociaciones público-privadas cuyo objetivo principal ha sido llenar el vacío entre la investigación científica básica, que suele ser financiamiento público, y el desarrollo clínico, que suele ser financiado por las compañías farmacéuticas.

Entre NTDs, hay un grupo de enfermedades, cuyo agente etiológico pertenecen a la familia de los tripanosomátidos del orden kinetoplastida, que son responsables de infecciones concentradas en los más pobres, principalmente en las zonas rurales del planeta y que se agrupan bajo el nombre de "enfermedades más descuidadas". En particular el *Trypanosoma*, es el responsable de la Enfermedad de Chagas en el Sur de América y con una alta tasa de mortalidad. Es por ello que el desarrollo de medicamentos en esta área es hoy día un reto.

#### **1.4.1. Importancia de la Enfermedad de Chagas a nivel mundial y en Venezuela.**

La enfermedad de Chagas o Mal de Chagas, también conocida como Tripanosomiasis Americana, es una de las enfermedades protozoarias tropicales más serias, considerándose un padecimiento endémico de América Latina, distribuyéndose desde México hasta Argentina, aunque existen vectores

y reservorios incluso en el sur de los Estados Unidos, con mayor prevalencia en las regiones rurales más pobres de América Latina (**figura 9**).<sup>39</sup>



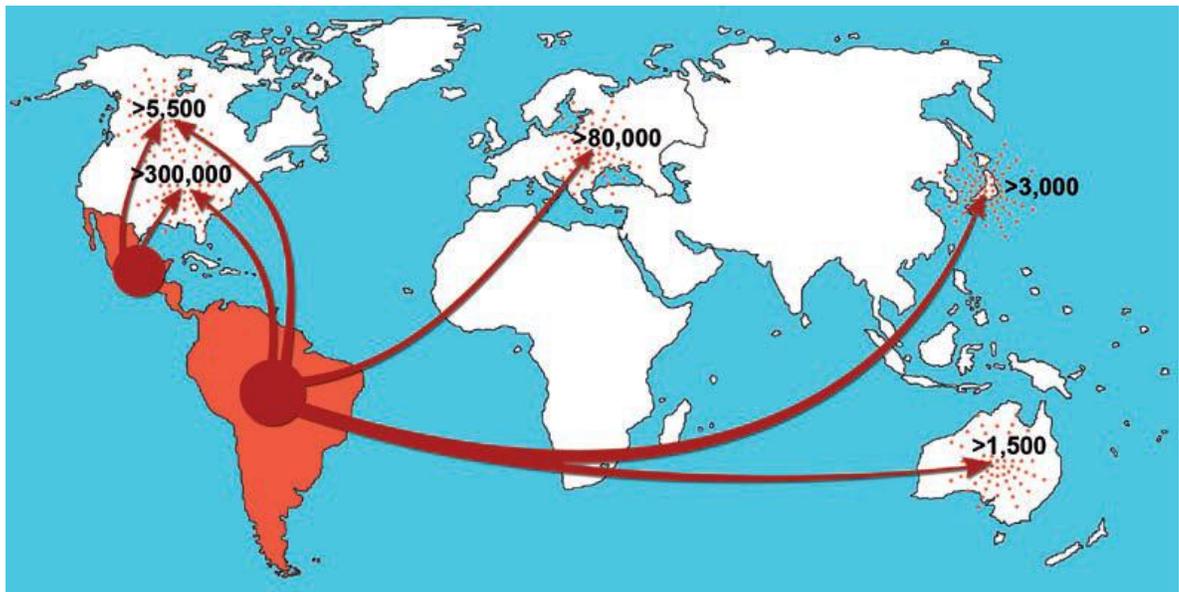
**Figura 9.** Mapa de incidencia de la Enfermedad de Chagas.<sup>39</sup>

La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que la enfermedad de Chagas afecta entre 16 y 18 millones de personas cada año, con unas 100 millones de personas (25% de la población de Latinoamérica) que están en riesgo de contraer la enfermedad, de las cuales mueren unas 50.000 personas anualmente.<sup>39-41</sup>

La enfermedad estaba establecida casi exclusivamente en áreas rurales, donde el insecto transmisor, correspondiente a la subfamilia de los Triatominae, puede reproducirse y alimentarse en su reservorio natural (las más comunes son el armadillo y marsupiales). Actualmente, el incremento en la migración de poblaciones, ha creado nuevos desafíos epidemiológicos, económicos, sociales y políticos, como la propagación de *T. cruzi* a los países desarrollados, donde

ya se había erradicado la enfermedad. La posibilidad de transmisión por transfusión sanguínea ha llegado a ser sustancial.<sup>30-41</sup>

El *T. cruzi* puede viajar con los movimientos de población de los países endémicos a no endémicos como América del Norte (Estados Unidos y Canadá), la Región del Pacífico Occidental (especialmente Japón y Australia) y, más recientemente, Europa (principalmente en Bélgica, España, Francia, Italia, el Reino Unido y Suiza, y en menor medida, Alemania, Austria, Croacia, Dinamarca, los Países Bajos, Luxemburgo, Noruega, Portugal, Rumanía y Suecia). Se ha estimado que hay ahora alrededor de 300.000 personas infectadas por *T. cruzi* en los Estados Unidos, 5500 en Canadá, 80.000 en Europa y en la región occidental del Pacífico, 3000 en Japón y 1500 en Australia (figura 10).<sup>39-41</sup>



**Figura 10.** Rutas de migración desde América Latina y el número de infectados en países no endémicos.<sup>40</sup>

La enfermedad de Chagas se ha convertido en algo más que una enfermedad zoonótica que afecta principalmente a los pobres de las áreas rurales en América Latina: es una preocupación en todo el mundo que puede tener graves consecuencias para la salud humana a largo plazo. Si no se toma en serio, podría convertirse en una amenaza importante para la salud.<sup>39</sup>

En Venezuela, el brote epidémico de enfermedad de Chagas en la capital (diciembre 2007) y el Estado Vargas (marzo 2009), han generado una alerta epidemiológica y gran consternación en la comunidad médica, sanitaria y la población en general. Estas series de casos tienen la peculiaridad de ser los primeros brotes de Chagas agudo registrados por transmisión oral o enfermedad transmitida por alimentos (ETA) estudiados en Venezuela. Clásicamente se conocen las vías de transmisión por vectores (de la familia Reduviidae; Triatoma, Rhodnius y Panstrongylus); por transmisión congénita (transplacentaria); por leche materna (muy raro pero posible); por transfusiones, trasplante de órganos y tejidos; y por manipulación de insectos y animales.<sup>39-41</sup>

El número absoluto de muertes sigue siendo elevado, con promedio de 769 muertes anuales. El riesgo de los venezolanos de morir por la enfermedad de Chagas es fundamentalmente de los adultos mayores, situación que se explica por la cronicidad de la enfermedad y la mayor longevidad debido a la atención médica recibida. Las muertes registradas por Chagas son en su inmensa mayoría (más del 99 %) en la forma de presentación crónica y son más frecuentes en adultos mayores. Las muertes por Chagas agudo son realmente raras. En relación con los órganos afectados por la enfermedad de Chagas, el

corazón es definitivamente la causa de muerte más frecuente; se reportan 4609 muertes como que afectan al corazón del total de 4630 defunciones registradas por enfermedad de Chagas, es decir, el 99,5 %.<sup>39-41</sup>

A pesar, de ser Venezuela uno de los primeros países en elaborar una campaña nacional contra la enfermedad de Chagas en 1961 logrando reducir la prevalencia de la enfermedad y el tamaño del área endémica; en los últimos años la prevalencia enfermedad parece haber aumentado, así como la densidad del vector en la viviendas han vuelto a reemerger.

#### **1.4.2. Aspectos generales de la Enfermedad de Chagas**

La tripanosomiasis americana, posteriormente denominada enfermedad de Chagas en homenaje a su descubridor, el investigador brasileño Carlos Chagas, es una importante enfermedad cuyo agente etiológico es un protozooario flagelado digenético, el *Trypanosoma cruzi* de la Clase Kinetoplastea, Orden Trypanosomatida y Familia Trypanosomatidae caracterizado por la presencia de un solo flagelo y una sola mitocondria, dentro de la cual su genoma se encuentra ordenado en una compleja y compacta red denominada cinetoplasto.<sup>42</sup>

Es un parásito intracelular con un ciclo de vida que involucra vertebrados e invertebrado, el reservorio natural lo constituyen los armadillos, marsupiales (*Didelphis* o zarigüeyas), roedores, murciélagos y primates silvestres, además de ciertos animales domésticos como perros, gatos, incluso ratas y los cobayos; y es transmitida al hombre comúnmente por los triatominos

hematófagos, que son una subfamilia de insectos perteneciente a la familia Reduviidae del orden Heteroptera/Hemiptera como el *Triatoma infestans* (estos insectos llevan varios nombres de acuerdo al país, entre ellos, benchuca, vinchuca, kissing bug, chipo, chupança, barbeiro, chincha y chinches), el cual transmite el parásito cuando defeca sobre la picadura que él mismo ha realizado para alimentarse (la persona a menudo se frota las picaduras, introduciendo accidentalmente las heces en la herida, un corte abierto, los ojos o la boca), por transfusión de sangre contaminada, por la ingesta de alimentos contaminados por el parásito o verticalmente de la madre infectada al feto. Los animales pueden infectarse de la misma forma y también contraen la enfermedad comiendo un insecto infectado **(figura 11)**.<sup>43-45</sup>



**Figura 11.** *Triatoma infestans*.<sup>44</sup>

El ciclo de vida del parásito se completa al infectar la sangre y otros tejidos de los reservorios y en el tubo digestivo de los vectores, en estos últimos sufre distintas transformaciones **(figura 12)**.<sup>43-45</sup>

En el humano:<sup>43-45</sup>

- El parásito transmitido al hospedador vertebrado en las heces del insecto es llamado en esta etapa tripomastigote metacíclico. En la sangre, el parásito se observa como un tripomastigote fusiforme, en forma de "C" o de "S" de 20  $\mu\text{m}$  de largo por 1  $\mu\text{m}$  de ancho. Durante esta etapa, el tripomastigoto no se multiplica en la sangre del hospedero.
- Cuando el parásito infecta las fibras del músculo cardíaco estriado o a los fagocitos, se acorta el flagelo y se transforma en un amastigote redondo de 2 a 5  $\mu\text{m}$  de diámetro y con un flagelo externo muy corto o inexistente, este se multiplica por medio de fisión binaria formando "racimos" o "nidos" que se acumulan en la célula huésped hasta que esta se rompe.
- Los parásitos liberados de la célula se convierten en promastigotos y tripomastigotos, estos, que son liberados a la sangre circulante, son de un tamaño total que varía entre 15 y 20 $\mu\text{m}$  tienen flagelo libre, un cinetoplasto voluminoso, terminal o subterminal que contiene el 30% del ADN del parásito y un núcleo oval. Estos tripomastigotes pueden infectar otras células, pero no son capaces de multiplicarse en la sangre ya que la única forma replicativa en el vertebrado es la forma amastigote intracelular e invaden otras células, para repetir el ciclo.

En el triatomino es:

- Cuando los triatominos nacen, están libres de la infección, pero adquieren al parásito al alimentarse del hombre o de los animales domésticos o silvestres infectados.
- Los tripomastigotes migran al intestino medio del insecto donde se transforman en epimastigotes, flagelados anchos, muy móviles, con el cinetoplasto entre el núcleo y el flagelo libre. Allí se dividen un gran número de veces, a partir de aquí las vinchucas, chinches, pitos o chipos quedan infectadas de por vida.
- Los epimastigotes se transforman en tripomastigotes metacíclicos y migran al intestino posterior de donde son excretados con las heces en el momento de la picadura. Mediante la degradación del ADN del cinetoplasto con enzimas restrictivas y su posterior análisis electroforético es posible la identificación de diferentes cepas de *T. cruzi*.



músculo cardíaco (miocardiopatía) y algunas veces la dilatación del tracto digestivo (megacolon y megaesófago) así como también puede haber pérdida de peso. Sin tratamiento, la enfermedad de Chagas puede ser mortal, por lo general debido al componente de miocardiopatía.<sup>45</sup>

Dos mecanismos fueron propuestos para las patogénesis en la fase crónica: reactividad inflamatoria debido a la persistencia del parásito dentro del tejido del hospedador e inducción de la respuesta autoinmune dirigida a los tejidos infectados.<sup>46</sup>

Aunque iniciativas de la OMS y de gobiernos de Latinoamérica hayan llevado al control de la transmisión vectorial de la enfermedad en diversas áreas endémicas por su principal vector, el *Triatoma infestans*, la inexistencia de vacuna y de tratamiento eficaz, principalmente para los pacientes con la forma crónica de la enfermedad, aún son desafíos a ser enfrentados.

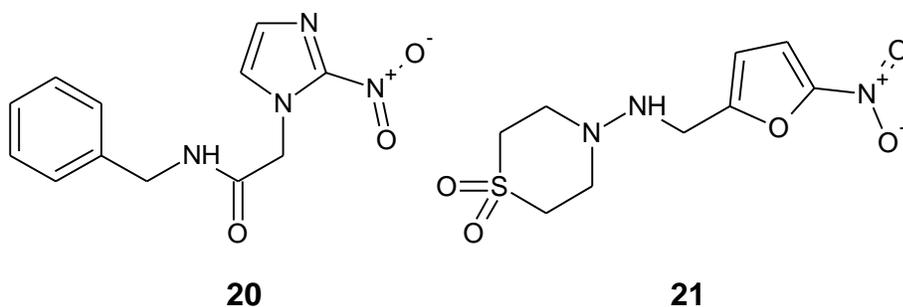
### **1.4.3. Tratamiento**

A pesar de los avances alcanzados en los controles vectorial y transfusional en los países de América Latina, la enfermedad de Chagas aún representa un serio desafío por su peculiar epidemiología, caracterizada por la diversidad de situaciones de riesgo (gran número de vectores y reservorios potenciales, variadas formas de infección y diferentes cantidades del parásito que circulan en el ambiente domiciliar, peridomiciliar y silvestre; por no disponer de medidas profilácticas y esquemas terapéuticos más eficientes, menos tóxicos y de bajo costo y por la falta de un conocimiento más completo de la fisiopatología de la

evolución de la enfermedad crónica. De esta forma, esta enfermedad sigue siendo un serio problema de salud pública por su importante posición entre las endemias rurales, y por segar muchas vidas en plena edad productiva. Aunque haya sido clasificada como potencial “candidata” a la eliminación y/o erradicación mundial, la enfermedad de Chagas, con las actuales herramientas de control, aún no puede ser rápidamente eliminada, volviéndose necesario expandir y sustentar los esfuerzos de control epidemiológico más allá del desarrollo de soluciones más definitivas, incluyendo aquellas relacionadas a la quimioterapia.<sup>43-45</sup>

Estos datos refuerzan la necesidad de desarrollar nuevas estrategias profilácticas y terapéuticas, incluyendo la identificación de nuevos fármacos tripanocidas e inmunomoduladores que proporcionen el control del parasitismo y contribuyan con la modulación de la inflamación crónica no benéfica.<sup>46</sup>

El arsenal quimioterapéutico disponible hasta el momento para la enfermedad de Chagas son los compuestos nitoaromáticos benzinidazol **20** (Radanil, Roche) y nifurtimox **21** (Lampit, Bayer, discontinuado para el público). Ambos compuestos fueron introducidos empíricamente en las décadas de los 60 y 70 del siglo pasado: hoy en día se conoce que actúan por la vía de la generación de radicales libres; a lo cual los parásitos tripanosomatídeos son particularmente sensibles por su limitada capacidad de detoxificación. El grupo nitro se reduce a un grupo amino por la acción de una aminoreductasa.<sup>47</sup>



Ninguno de estos compuestos es ideal porque: no son activos durante la fase crónica de la enfermedad y presentan serios efectos colaterales, requieren administración por largos períodos bajo supervisión médica, hay una gran variación en la susceptibilidad de aislados del parásito a la acción de estos fármacos, han sido relatadas poblaciones de parásitos resistentes a ambos compuestos, presentan alto costo, y no hay formulaciones pediátricas, a pesar de que los niños de hasta 12 años tienen más posibilidades de beneficiarse con el tratamiento ya que no presentan aún la sintomatología crónica de la enfermedad. Ambos compuestos han sido principalmente utilizados en el tratamiento de pacientes agudos y crónicos recientes, en los cuales se observan resultados positivos, principalmente en niños ( $\leq 15$  años), calculando un porcentaje promedio de cura de alrededor de 80%, en el tratamiento de infecciones congénitas, transplantes de órganos de donantes infectados, cuadros de reagudización de pacientes inmunosuprimidos. Y, a pesar de que la mayoría de los estudios revele una baja eficiencia de estos fármacos durante la terapia de pacientes crónicos, evaluaciones recientes han sugerido el tratamiento para retardar o incluso evitar la evolución de la enfermedad crónica.

Tomando en cuenta estos hechos, se demuestra la urgente necesidad de desarrollar tratamientos específicos muchos más eficaces y selectivos, particularmente para el tratamiento de la fase indeterminada y crónica de la enfermedad de Chagas.<sup>48,49</sup> La identificación de nuevos agentes antichagásicos puede ser basada no solamente en el diseño racional de drogas y búsqueda de productos naturales, si no también, tomando ventaja de compuestos ya en uso contra otras enfermedades humanas. Por lo que, hay una necesidad urgente de identificar enzimas específicas y vías metabólicas en el parásito útiles como potenciales blancos para el desarrollo de nuevas drogas.<sup>50</sup>

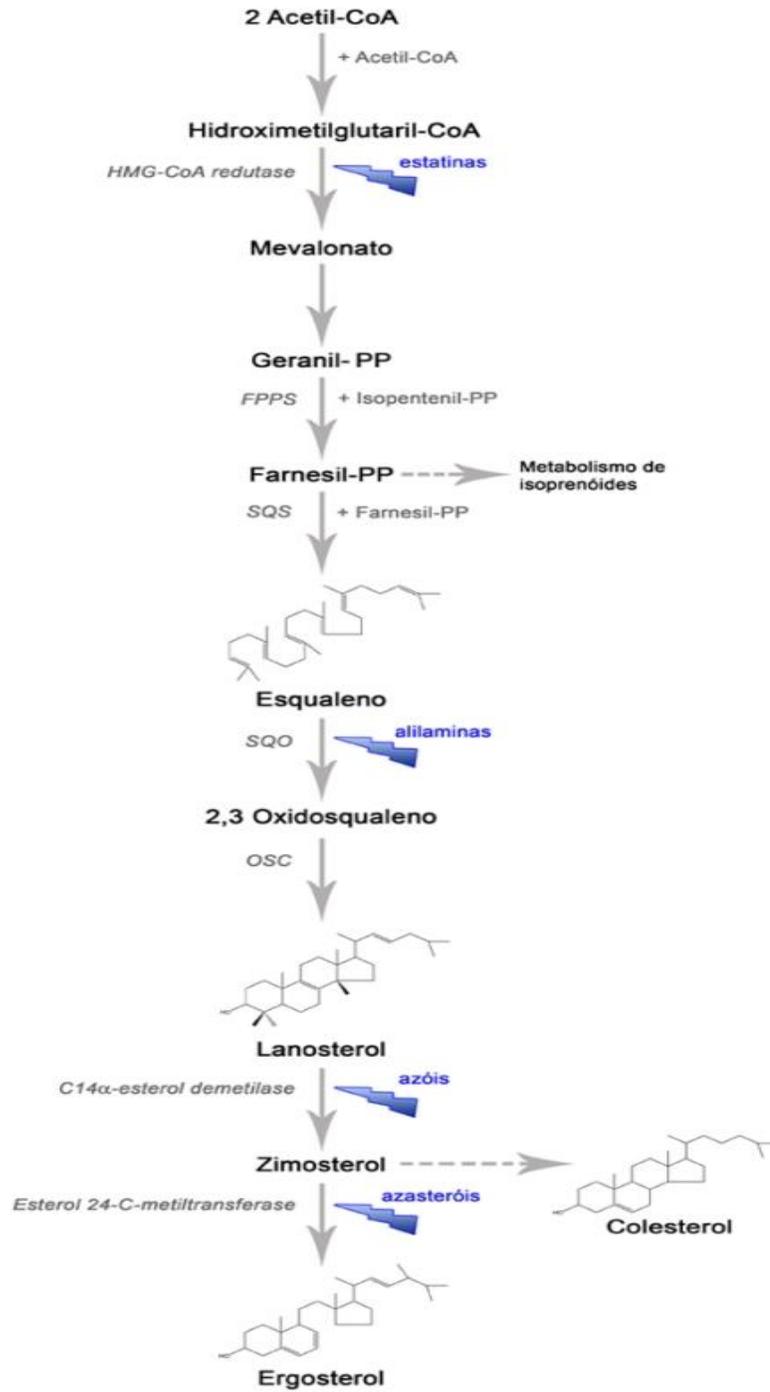
#### **1.4.3.1. Desarrollo de nuevos fármacos contra la enfermedad de Chagas**

De manera general, el desarrollo de una quimioterapia antiparasitaria ocurre por el establecimiento de principios activos de plantas utilizadas en medicina popular, por la investigación de fármacos ya aprobados para el tratamiento de otras enfermedades, ya que ellos fueron sometidos a ensayos clínicos muy caros, o a través de la determinación de blancos específicos identificados en vías metabólicas claves del parásito.

En las dos últimas décadas, el entendimiento de la biología y la bioquímica de *T. cruzi* ha permitido la identificación de múltiples blancos para la quimioterapia de la enfermedad de Chagas que incluyen el metabolismo de esteroides, ADN y diferentes enzimas. Entre ellos, se pueden nombrar como blancos potenciales principales para el desarrollo de nuevas drogas con actividad anti *T. cruzi*:<sup>50</sup>

- Ruta de Biosíntesis de esteroides

Los ergosteroles son componentes esenciales estructurales de la membrana celular. Los tripanosomatidos contienen esteroides en el plasma, en el interior mitocondrial y en la membrana glicosomal. El agotamiento de los productos finales de esterol causa la muerte celular tripanosomal como resultado de la ruptura de la membrana, especialmente en los estados de división exponenciales del parásito. El principal esteroide en el metabolismo de *T. cruzi* es el ergosterol en vez de colesterol a diferencia del hospedador humano, de esta forma, en este parásito, etapas de la biosíntesis de esteroides (**figura 13**), han sido intensamente estudiadas como blanco quimioterapéutico por el grupo de Urbina en Venezuela. La identificación de inhibidores de la biosíntesis de ergosterol (EBIs), muestra esta ruta como un prominente blanco para la quimioterapia contra *T. cruzi*. Entre las enzimas de la biosíntesis de esterol, blanco de drogas potenciales en el tratamiento de la enfermedad de Chagas, pueden ser mencionadas las siguientes enzimas de esta ruta metabólica;<sup>50-52</sup>



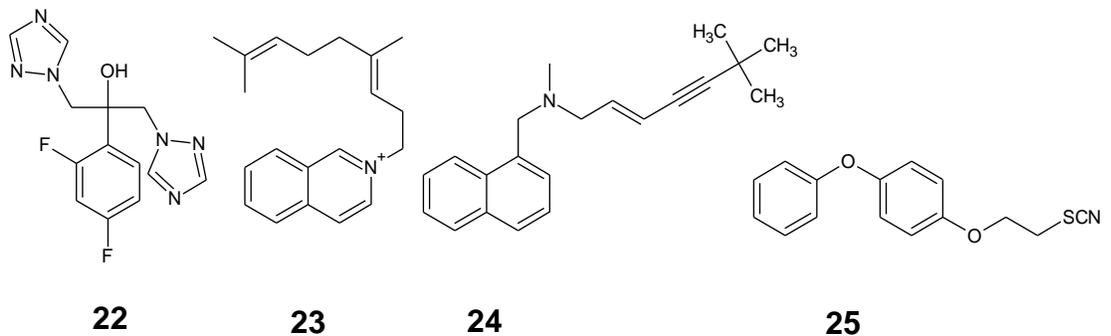
**Figura 13.** Vía de síntesis de esteroides de acetato a ergosterol y colesterol. Los sitios de acción de los inhibidores de la biosíntesis de esteroides están marcados en azul.<sup>51</sup>

- Esterol C14  $\alpha$ -demetilasa; cataliza la desmetilación del C14 del anillo D, en la primer etapa de la vía del lanosterol, llevando a zimosterol. Entre los fármacos que actúan sobre este blanco se encuentran, los inhibidores azole, como el fluconazol **22**.

- Oxidosqualeno ciclasa o lanosterol sintetasa (OSC); cataliza la ciclización de 2,3-oxidosqualeno a lanosterol. Esta enzima es Inhibida por fármacos no azoles, como inhibidores de base ion piridinium y feniltiovinil derivados **23**.

- Squaleno epoxidasa; cataliza la conversión de squaleno a 2,3-oxidosqualeno. Es inhibida por fármacos de base allilamina **24**.

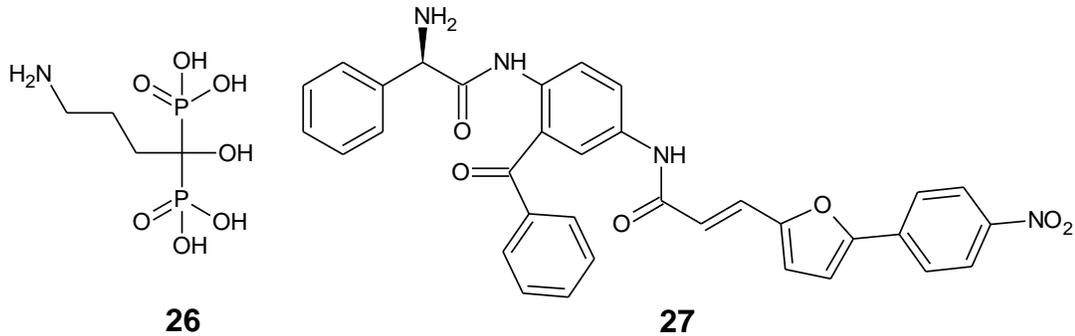
- Squaleno sintetasa; Interviene en el primer paso de la biosíntesis de esterol, catalizando la dimerización reductiva de dos moléculas de farnesil pirofosfato (FPP), entre los fármacos que inhiben este blanco potencial se encuentran los derivados de tiocianato y los inhibidores de base quinuclidina **25**.



- Biosíntesis de poliisoprenoides

Se encuentran como fármacos potenciales los bifosfanatos **26**, que inhiben la enzima farnesil pirofosfato sintetasa (FPPS) responsable de la formación de

farnesil pirofosfato, que marca el punto en la síntesis de una variedad de esteroides y otros isoprenoides esenciales; y los inhibidores de la enzima farnesiltransferasas **27**, la cual cataliza la transferencia de un residuo de farnesil desde farnesil pirofosfato a el tior de una cadena lateral de cisteína.<sup>50</sup>

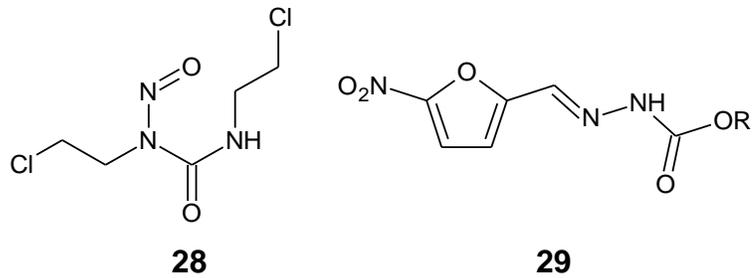


- Metabolismo redox tior-dependiente

Presente en los Trypanosomatidos, el cual está basado en trypanotiona, una tior-poliamina conjugada de bajo peso molecular exclusivamente encontrada en este protozoo y enzimas específicas incluyendo una trypanotiona reductasa (TR). La sensibilidad del trypanomatidos hacia el estrés oxidativo y la ausencia de TR en el hospedador, valida la enzima como un blanco para el diseño de nuevas drogas. Entre los inhibidores de Trypanotionareductasa, encontramos,<sup>50</sup>

- Inhibidores Irreversibles **28**.

- Inhibidores reversibles **29**.



- **Proteinasas**

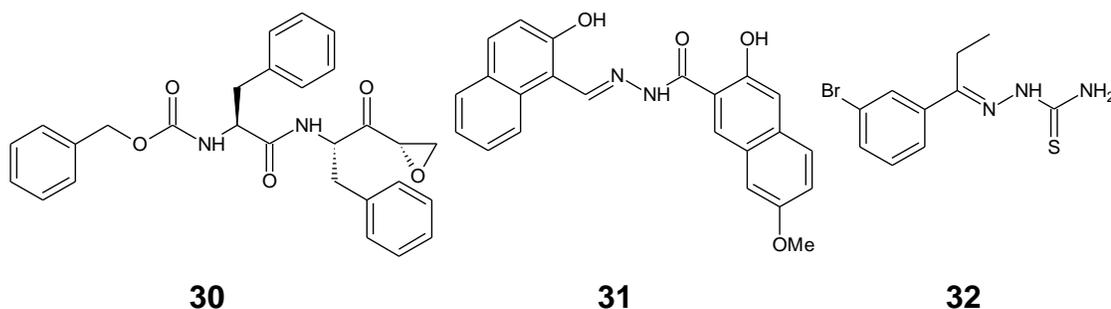
Han sido involucradas en la invasión del hospedador, en la migración del parásito a través de las barreras tisulares, en la degradación de la hemoglobina y otras proteínas sanguíneas, en la evasión inmune como también en la activación de los procesos de inflamación. El *T. cruzi* contiene cisteína, serina, treonina y metaloproteinasas.<sup>53</sup>

La Proteínasa Cisteína es una de las más estudiadas, regula la interacción hospedador-parásito involucrándose en la modulación de una variedad de efectos patobiológicos que incluyen la absorción de nutrientes, la evasión inmune y la degradación de los tejidos del hospedador. La inhibición específica de esta enzima por inmunoprofilaxis o quimioterapia puede potencialmente perjudicar el mecanismo de supervivencia del parásito. Entonces, las proteinasas cisteínas son prominentes blancos para vacunas y quimioterápicos.<sup>53</sup>

Cruzipain (Cz), también conocida como cruzain, es el miembro más abundante de la familia papain C1 de las cisteínas proteinasas (CPs) del parásito. La enzima es un antígeno inmunodominante en la enfermedad de

Chagas crónica en humanos y parece ser importante en la relación hospedador-parásito, esto fue asociado con la virulencia, la interacción entre las isoformas de Cz enlazadas a la membrana plasmática con las alfa-macroglobulinas humanas, también se ha demostrado que la enzima es esencial para la replicación intracelular del parásito. Entre los inhibidores CPs estudiados, se puede mencionar;<sup>54</sup>

- Inhibidores Peptídicos Irreversibles **30**.
- Inhibidores Peptídicos Reversibles **31**.
- Inhibidores No Peptídicos **32**.



También, se han reportado compuestos aislados de fuentes naturales, particularmente de origen vegetal como también análogos semi-sintético con actividad tripanocida, entre las cuales se encuentran; los agentes anti-microtúbulo, alcaloides, estilbenoides, naftoquinonas naturales, terpenos, flavonoides y derivados quinolina, entre otros.<sup>50</sup>

Vale la pena mencionar, que a pesar del incremento abrupto del conocimiento acerca de la bioquímica del parásito, este no se refleja en el número de

patentes reveladas, además, un escaso número de publicaciones muestran datos específicos de actividad biológica anti *T. cruzi*.<sup>50</sup>

Tomando en cuenta, el poco interés de las compañías farmacéuticas en el desarrollo de nuevos agentes antichagásicos lo que deja la Enfermedad de Chagas como una de las más olvidadas del mundo, nuestro grupo ha propuesto una nueva estrategia para el desarrollo de compuestos anti *T. cruzi*, en la cual se ha intentado identificar compuestos que han sido desarrollos para otras aplicaciones, como en nuestro caso, Cáncer.

### **1.5. Estudio del farmacóforo**

Uno de los blancos de interés para nosotros, es el proceso de vascularización del tumor, Como ya se señaló anteriormente, los compuestos que actúan a este nivel pueden, ya sea interrumpir la vascularización del tumor alterando el ciclo celular de las células endoteliales de los vasos sanguíneos ya formados o pueden actuar inhibiendo el proceso de formación de nuevos vasos sanguíneos, como es el caso de los fármacos que actúan a nivel de la MMPs

En vista a las diferencias estructurales que pueden existir entre los diferentes inhibidores de las MMPs resulta fundamental para el desarrollo de nuevos fármacos más selectivos, investigar las características estructurales comunes entre ellos para la interacción con estas proteínas. En los últimos años se han realizado pocos estudios sobre el farmacóforo de los inhibidores de MMPs, Wolfran Bode y colaboradores,<sup>55</sup> publicaron un estudio de docking de cinco inhibidores de MMP-9 estructuralmente diferentes, con la finalidad de facilitar el

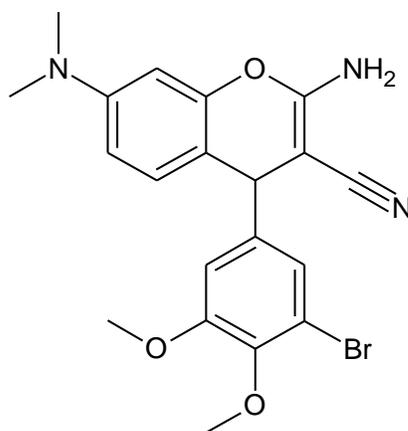
diseño de compuestos más selectivos a MMP-9. En su investigación encontraron que la geometría de estos compuestos sigue varios requisitos comunes, es decir, la interacción ligando-metal con ión zinc catalítico, apropiadas interacciones de van Der Waals con el sitio activo, óptimas interacciones de enlaces de hidrógeno con el bolsillo S1' y la óptima inserción de la porción hidrofóbica de la molécula dentro del cavidad S1' de la proteína. La optimización simultánea de estas cuatro interacciones requiere compromisos estructurales, que aún no se encuentran descritos con certeza. Elucidar los requerimientos estructurales necesarios de inhibidores selectivos de MMP-9 para su óptima interacción puede ser útil para el desarrollo de una terapia efectiva contra el Cáncer.<sup>55</sup>

Las consideraciones antes expuestas, nos motivaron a incluir en este trabajo un estudio de hipótesis de farmacóforo, utilizando un grupo de compuestos estructuralmente diversos inhibidores de la MMP-9, a fin de proponer las características mínimas estéricas y electrónicas necesarias para obtener inhibidores selectivos de MMP-9.<sup>55</sup>

### **1.6. Relación estructura-actividad biológica de nuevas moléculas**

En años recientes, se han diseñado y sintetizado heterociclos derivados del núcleo cromeno, 4-aril-4H-cromenos, 4-aril-benzo[h]cromenos y su aza análogo fusionado 4-aril-benzo[h]quinolina que han sido identificados como compuestos biológica y medicinalmente interesantes al exhibir un amplio rango de actividad biológica, tal como; antimicrobianos y citotóxicos-antitumorales.<sup>56</sup>

Los derivados del núcleo cromeno, en general, han mostrado ser una serie de compuestos inhibidores de la tubulina, enlazándose al sitio de unión de la colchicina **33**, lo cual puede resultar en la detención del ciclo celular, la inducción de la apoptosis e inhibición de la proliferación celular; estos agentes también interrumpen la neovascularización del tumor, lo cual puede resultar en una disminución del flujo de sangre y necrosis del tumor, lo que los caracteriza como drogas VADs.<sup>57</sup> Los derivados 2-amino-4-aryl-3-ciano-4H-cromeno (p.ej. MX58151 **34**) han mostrado potentes efectos de inhibición in vitro e in vivo de la polimerización de tubulina, actuando en el mismo sitio activo donde se enlaza la colchicina, y mostraron actividad in vitro e in vivo como agentes interruptores de la vascularización del tumor (VDAs).<sup>56</sup>



**34**



A3) un donador de enlaces de hidrógeno (D1), dos centros hidrofóbicos (H1, H2) y un grupo planar (R1).<sup>59</sup>



**Figura 15.** Estructuras Bidimensionales. La esfera roja, rosada, amarilla, morado y azul representan los puntos farmacofóricos A1, A2, A3, D1 y H1, respectivamente. Las líneas azul claro y verde corresponden a los puntos H2 y R1, respectivamente.<sup>59</sup>

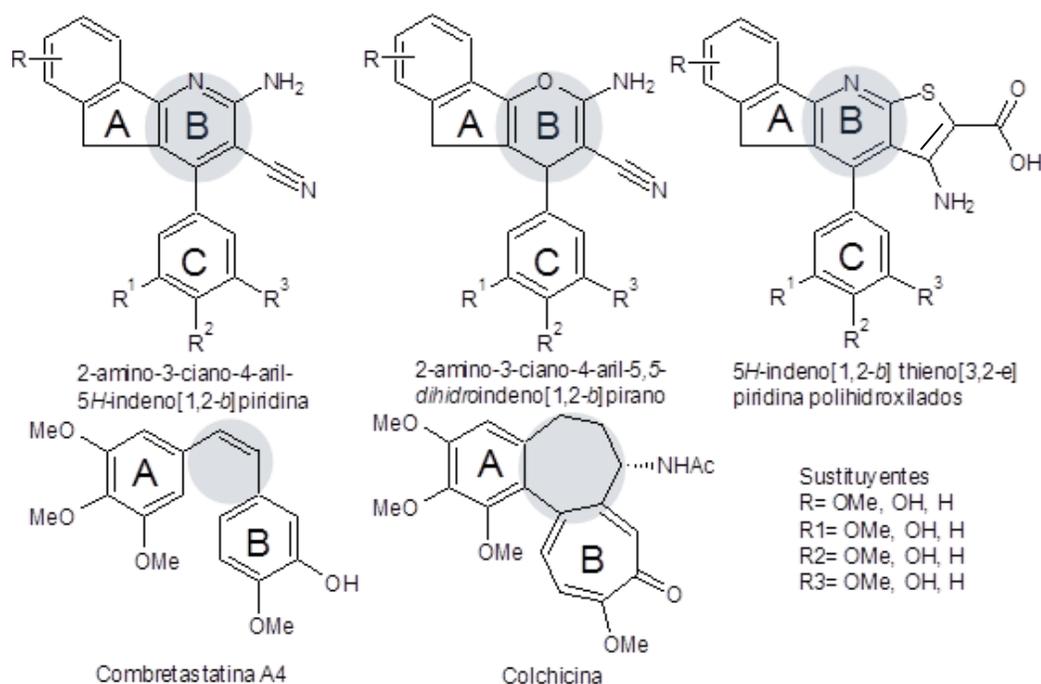
Los grupos hidrofóbicos y planares, H2 y R1, respectivamente, sirven como la porción rígida de la estructura molecular que satisface todos los requerimientos de geometría y estéricos necesarios para la unión a tubulina, mientras que los puntos A1, A2, A3, D1 y H1 forman interacciones críticas con la proteína.

En general, los compuestos que se unen al dominio de la colchicina guardan una homología estructural con el anillo A y C de la colchicina. Esta característica común ha sido descrita como un sistema biaril conectado por un puente hidrocarbonado de longitud variable.<sup>60</sup>

Otros estudios de relación estructura-actividad sobre el sistema estilbeno de las combretastatinas demuestran que la orientación cis de los dos anillos benceno y los sustituyentes 3, 4, 5-trimetoxi en el anillo A son esenciales para la actividad citotóxica, sin embargo, el tamaño del anillo B no es crítico para la unión a Tubulina.<sup>61</sup>

En vista de las evidencias presentadas en cuanto a los modelos de unión y al farmacóforo nosotros nos planteamos un diseño de fármacos análogo de colchicina, con posible actividad sobre el proceso de vascularización del tumor y anti *T. cruzi*, como el ya mencionado tipifarnib.

En este sentido en el presente trabajo se plantea la síntesis de derivados de 4-aril-5H-indeno[1,2-b]piridina y 4-aril-4,5-dihidroindeno[1,2-b]pirano polihidroxilados, y evaluar su actividad citotóxica-antitumoral y antiparasitaria, con la finalidad de introducir un aporte al área de la química medicinal de nuevos compuestos que pudieran ser considerados como posibles agentes quimioterápicos y antichagásicos.



**Figura 16.** Relación estructural del 4,5-dihidroindeno[1,2-b]pirano y su aza análogo fusionado 5H-indeno[1,2-b]piridina con respecto a la colchicina y la combretastatina. La esfera azul representa el puente hidrocarbonado de longitud variable, que enlaza el sistema biaril.

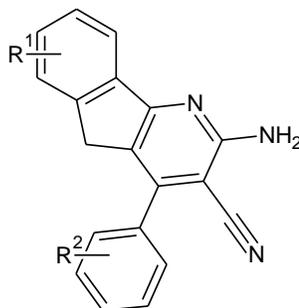
## 2. Objetivos

### 2.1. Objetivo general

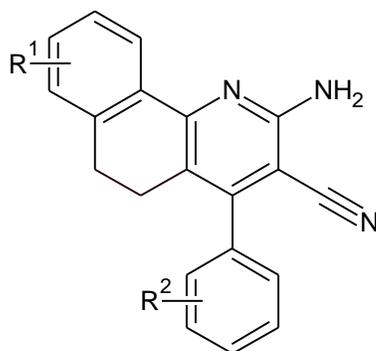
- Sintetizar derivados de 5H-indeno[1,2-b]piridina, 4,5-dihidroindeno[1,2-b]pirano y 5H-indeno[1,2-b]tieno[3,2-e]piridina polihidroxilados y evaluar su posible actividad biológica citotóxica-antitumoral y antichagásica.

### 2.2. Objetivos específicos

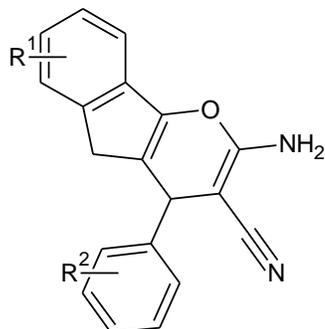
- Sintetizar derivados del tipo 5H-indeno[1,2-b]piridina polihidroxilados.



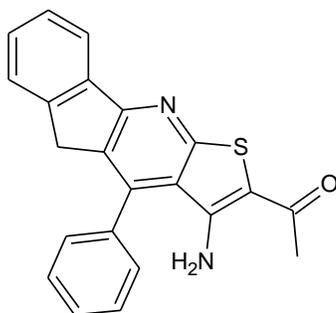
- Sintetizar derivados del tipo 5,6-dihidrobenzo[h]quinolina polihidroxilados.



- Sintetizar derivados del tipo 4,5-dihidroindeno[1,2-b]pirano polihidroxilados.



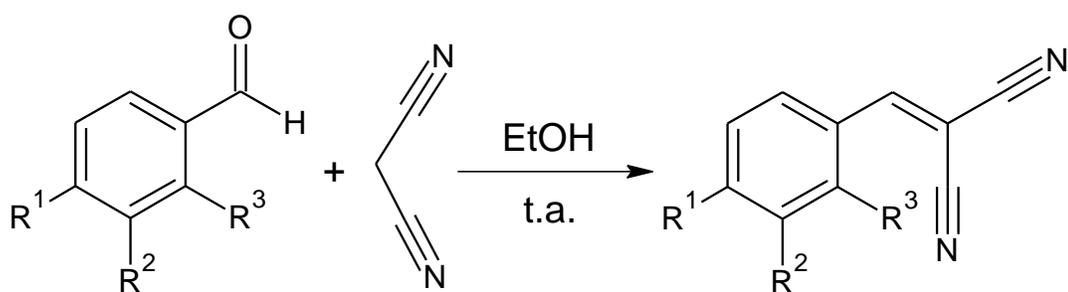
- Sintetizar derivados del tipo 5H-indeno[1,2-b]tieno[3,2-e]piridina polihidroxilados.



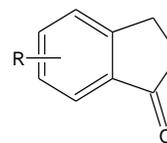
- Caracterizar los compuestos sintetizados a través de técnicas espectroscópicas (IR, RMN<sup>1</sup>H/<sup>13</sup>C, Dept 135, HETCOR, FLOCK), cristalografía de rayos x, análisis elemental y sus propiedades físicas.
- Evaluar la actividad citotóxica-antitumoral y antichagásica de los compuestos a sintetizar.

## 2.3. Esquemas de Síntesis

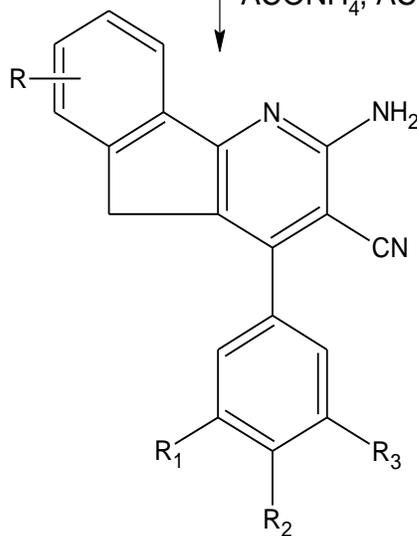
### 2.3.1. Esquema de Síntesis 1



**KC1**



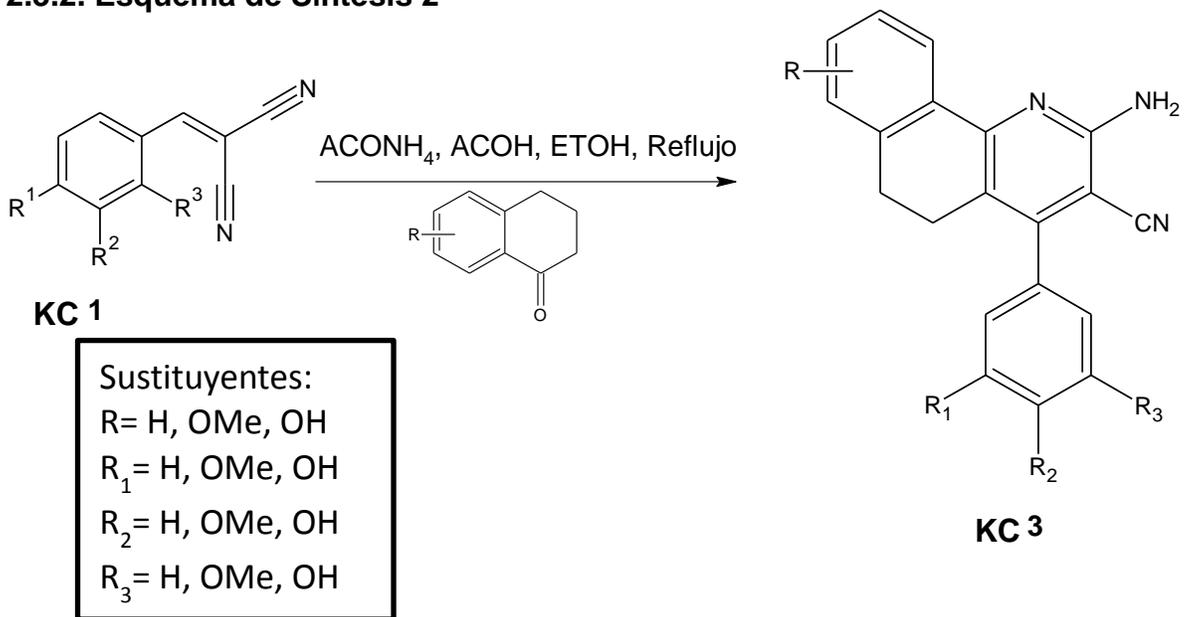
$\text{ACONH}_4$ ,  $\text{ACOH}$ ,  $\text{ETOH}$ , Reflujo



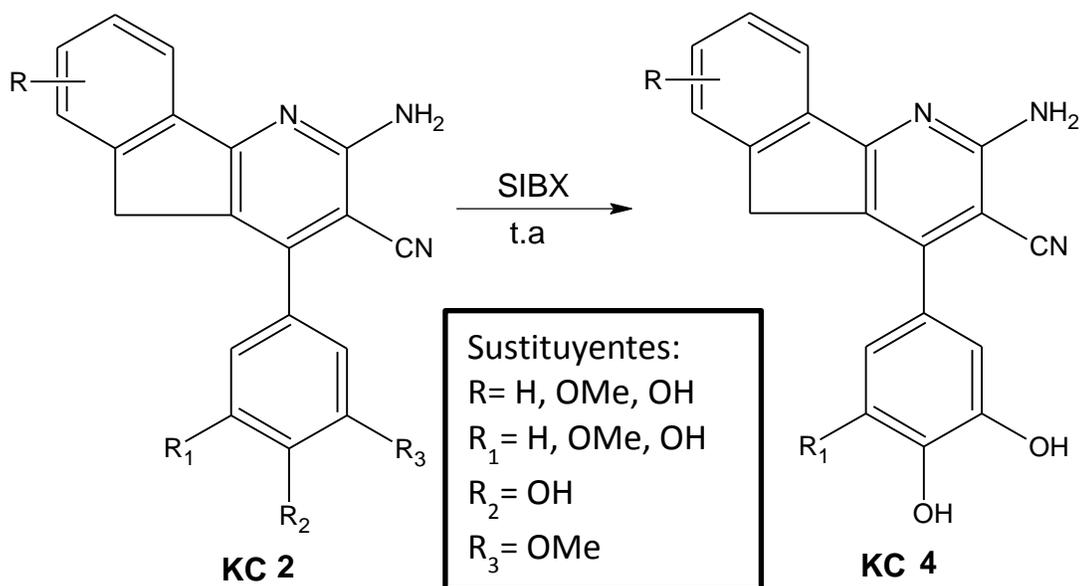
**KC2**

Sustituyentes:  
 $R = \text{H, OMe, OH}$   
 $R_1 = \text{H, OMe, OH}$   
 $R_2 = \text{H, OMe, OH}$   
 $R_3 = \text{H, OMe, OH}$

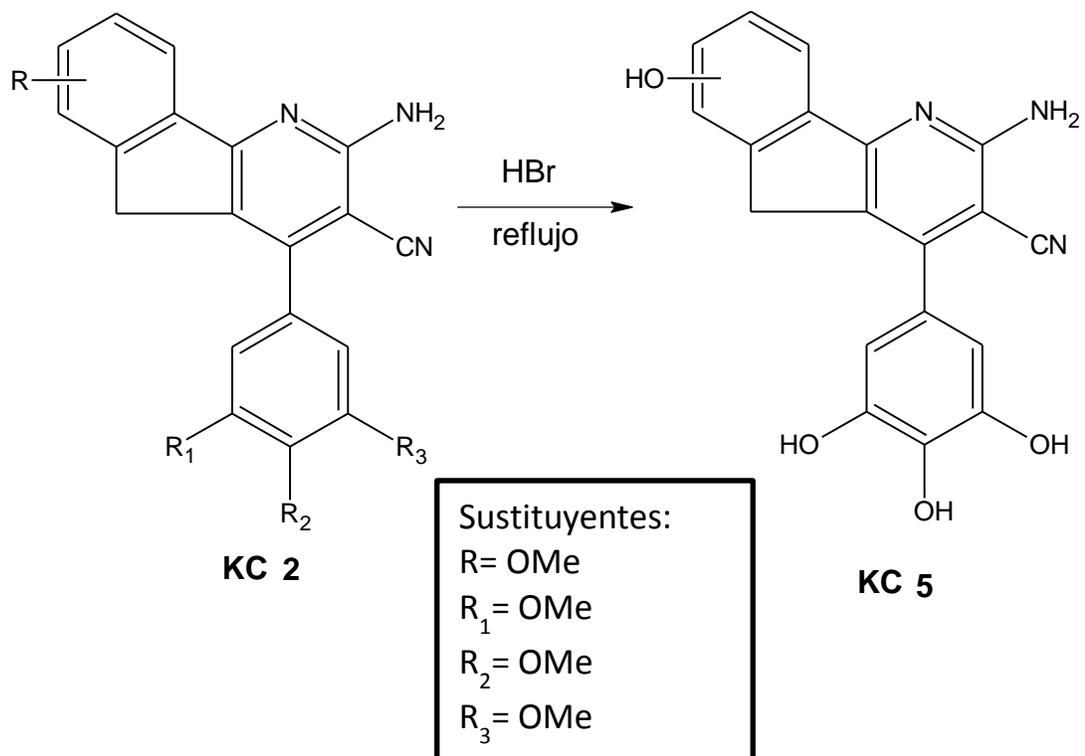
### 2.3.2. Esquema de Síntesis 2



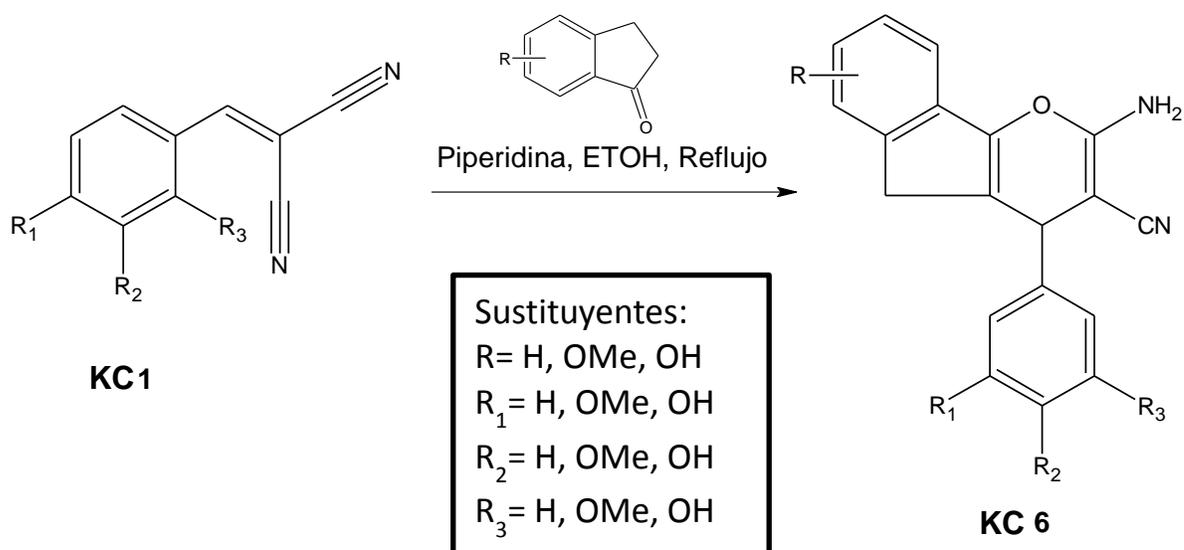
### 2.3.3. Esquema de Síntesis 3



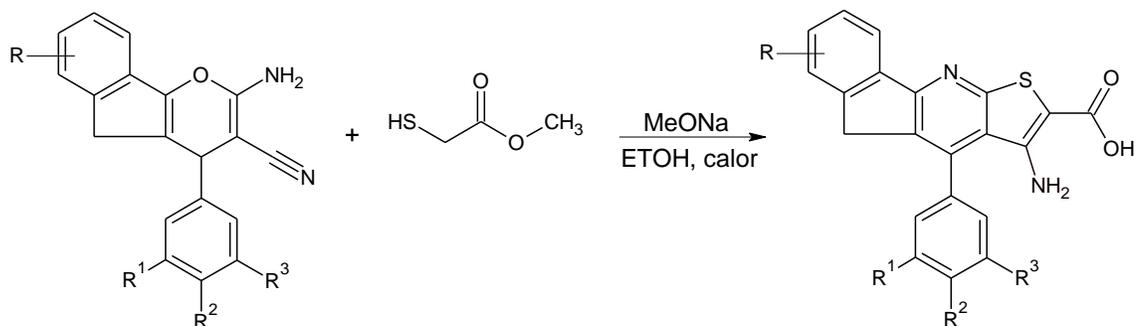
### 2.3.4. Esquema de Síntesis 4



### 2.3.5. Esquema de Síntesis 5



### 2.3.6. Esquema de Síntesis 6



**KC 6**

Sustituyentes:

R = H, OMe, OH

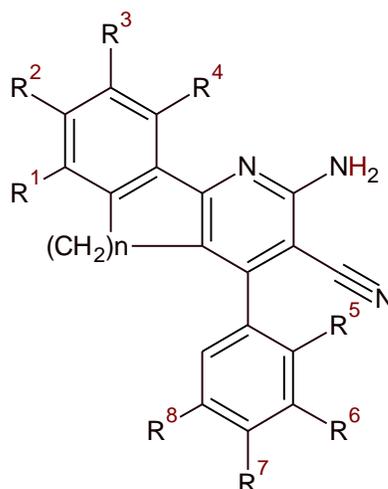
R<sub>1</sub> = H, OMe, OH

R<sub>2</sub> = H, OMe, OH

R<sub>3</sub> = H, OMe, OH

**KC 7**

En el presente estudio, una serie de derivados 5H-indeno[1,2-b]piridina **KC2** y 5,6-dihidrobenzo[h]quinolina **KC3**, han sido sintetizados y evaluada su actividad citotóxica-antitumoral y antichagásica (**tabla I**)



**Tabla I.** Estructura de los derivados KC sintetizados.

| Código        | R <sup>1</sup> | R <sup>2</sup> | R <sup>3</sup> | R <sup>4</sup> | R <sup>5</sup> | R <sup>6</sup> | R <sup>7</sup> | R <sup>8</sup> |
|---------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| <b>KC2-5</b>  | H              | H              | H              | H              | H              | OMe            | OMe            | OMe            |
| <b>KC2-16</b> | H              | H              | H              | H              | H              | OMe            | OH             | H              |
| <b>KC2-35</b> | H              | H              | H              | H              | H              | OMe            | OH             | OMe            |
| <b>KC2-64</b> | H              | H              | H              | H              | H              | OMe            | OMe            | H              |
| <b>KC2-65</b> | H              | H              | H              | H              | OMe            | H              | OMe            | H              |
| <b>KC2-33</b> | OMe            | H              | H              | H              | H              | OMe            | OMe            | OMe            |
| <b>KC2-26</b> | OMe            | H              | H              | H              | H              | OMe            | H              |                |
| <b>KC2-66</b> | OMe            | H              | H              | H              | H              | OMe            | H              | OMe            |
| <b>KC2-67</b> | OMe            | H              | H              | H              | H              | OMe            | OMe            | H              |
| <b>KC2-32</b> | H              | OMe            | H              | H              | H              | OMe            | OMe            | OMe            |

|               |     |     |     |     |     |     |     |     |
|---------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| <b>KC2-25</b> | H   | OMe | H   | H   | H   | OMe | OH  | H   |
| <b>KC2-37</b> | H   | OMe | H   | H   | H   | OMe | OH  | OMe |
| <b>KC2-50</b> | H   | OMe | H   | H   | H   | OMe | OMe | H   |
| <b>KC2-49</b> | H   | OMe | H   | H   | OMe | H   | OMe | H   |
| <b>KC2-30</b> | H   | H   | OMe | H   | H   | OMe | OMe | OMe |
| <b>KC2-24</b> | H   | H   | OMe | H   | H   | OMe | OH  | H   |
| <b>KC2-68</b> | H   | H   | OMe | H   | H   | OMe | OMe | OH  |
| <b>KC2-69</b> | H   | H   | OMe | H   | OMe | H   | OMe | H   |
| <b>KC2-29</b> | H   | H   | H   | OMe | H   | OMe | OMe | OMe |
| <b>KC2-23</b> | H   | H   | H   | OMe | H   | OMe | OH  | H   |
| <b>KC2-36</b> | H   | H   | H   | OMe | H   | OMe | OH  | OMe |
| <b>KC2-48</b> | H   | H   | H   | OMe | H   | OMe | OMe | H   |
| <b>KC2-38</b> | H   | OMe | OMe | H   | H   | OMe | OMe | OMe |
| <b>KC2-39</b> | H   | OMe | OMe | H   | H   | OMe | OH  | H   |
| <b>KC2-40</b> | H   | OMe | OMe | H   | H   | OMe | OH  | OMe |
| <b>KC2-45</b> | H   | OMe | OMe | H   | H   | OMe | OMe | H   |
| <b>KC2-44</b> | H   | OMe | OMe | H   | OMe | H   | OMe | H   |
| <b>KC2-55</b> | H   | OMe | OMe | H   | H   | OH  | OMe | H   |
| <b>KC2-41</b> | OMe | OMe | H   | H   | H   | OMe | OMe | OMe |
| <b>KC2-42</b> | OMe | OMe | H   | H   | H   | OMe | OH  | H   |
| <b>KC2-47</b> | OMe | OMe | H   | H   | H   | OMe | OH  | OMe |
| <b>KC2-46</b> | OMe | OMe | H   | H   | H   | OMe | OMe | H   |
| <b>KC2-56</b> | OMe | OMe | H   | H   | OMe | H   | OMe | H   |

|               |     |     |     |   |   |     |     |     |
|---------------|-----|-----|-----|---|---|-----|-----|-----|
| <b>KC3-8</b>  | OMe | H   | H   | H | H | OMe | OBn | H   |
| <b>KC3-51</b> | OMe | H   | H   | H | H | OMe | OMe | OMe |
| <b>KC3-15</b> | OMe | H   | H   | H | H | OMe | OH  | H   |
| <b>KC3-60</b> | OMe | H   | H   | H | H | OMe | OH  | OMe |
| <b>KC3-57</b> | OMe | H   | H   | H | H | OH  | OMe | H   |
| <b>KC3-7</b>  | H   | OMe | H   | H | H | OMe | OBn | H   |
| <b>KC3-52</b> | H   | OMe | H   | H | H | OMe | OMe | OMe |
| <b>KC3-17</b> | H   | OMe | H   | H | H | OMe | OH  | H   |
| <b>KC3-61</b> | H   | OMe | H   | H | H | OMe | OH  | OMe |
| <b>KC3-58</b> | H   | OMe | H   | H | H | OH  | OMe | H   |
| <b>KC3-6</b>  | H   | H   | OMe | H | H | OMe | OBn | H   |
| <b>KC3-53</b> | H   | H   | OMe | H | H | OMe | OMe | OMe |
| <b>KC3-18</b> | H   | H   | OMe | H | H | OMe | OH  | H   |
| <b>KC3-62</b> | H   | H   | OMe | H | H | OMe | OH  | OMe |
| <b>KC3-59</b> | H   | H   | OMe | H | H | OH  | OMe | H   |
| <b>KC3-9</b>  | H   | H   | H   | H | H | OMe | OBn | H   |
| <b>KC3-19</b> | H   | H   | H   | H | H | OMe | OH  | H   |

KC2 n=1, KC3 n= 2

### 3. Resultados y Discusión

#### 3.1. Sección Química

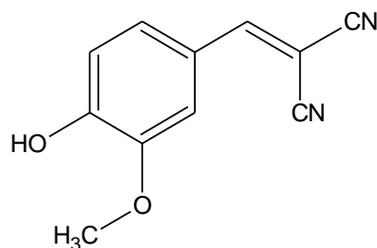
La estrategia diseñada para la obtención tanto de los derivados con núcleo de 5H-indeno[1,2-b]piridina **KC2**, como de los derivados con núcleo de 4,5-dihidroindeno[1,2-b]pirano **KC3** se fundamentó en un proceso de síntesis lineal de dos pasos respectivamente, dicha estrategia permitió la preparación de cincuenta y un moléculas orgánicas con posible actividad citotóxica-antitumoral y antichagásica.

El intermediario clave para la obtención de los derivados del tipo 5H-indeno[1,2-b]piridina y 4,5-dihidroindeno[1,2-b]pirano son los bencilidenemalononitrilos **KC1**, La síntesis de este intermediario se planteó como un proceso de una etapa a partir de malononitrilo y los derivados de benzaldehídos respectivos.

La síntesis planteada para los derivados bencilidenemalononitrilos se realizó según el **esquema de síntesis 1**.

Partiendo de los diferentes aldehídos sustituidos, se realizó una reacción de adición de malononitrilo al grupo carbonilo del aldehído seguido por un proceso de deshidratación para formar los correspondientes derivados bencilidenemalononitrilo **KC1**. En general, la obtención de los correspondientes derivados bencilidenemalononitrilo se corrobora por la presencia de una banda a  $2224\text{ cm}^{-1}$  en el IR correspondiente a las vibraciones de enlace C-N del grupo nitrilo (CN) y un singlete que integró para un protón con un desplazamiento

químico alrededor de 7,61 ppm correspondiente al protón olefinico (CH); en el experimento de RMN<sup>1</sup>H del compuesto obtenido.

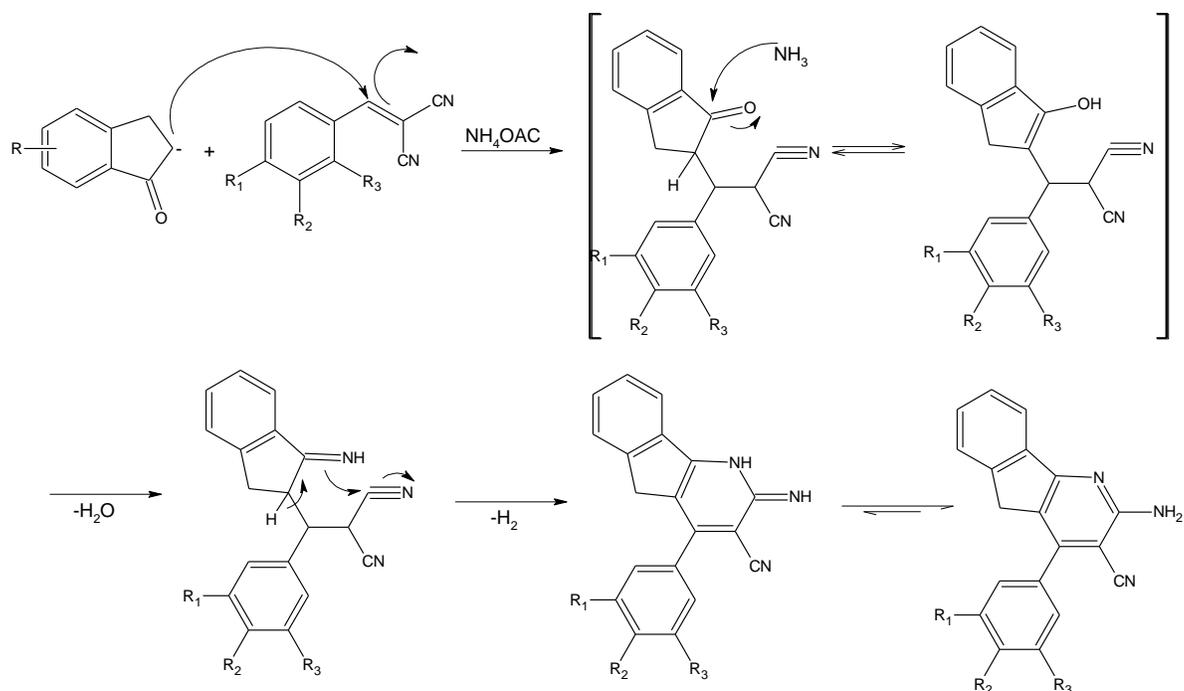


**KC1c**

Un ejemplo de esta familia de compuestos es el 3-metoxi-4-hidroxi benzilidenemalononitrilo **KC1c**, el cual presentó en el IR una banda ancha en 3328 cm<sup>-1</sup> correspondiente a las vibración de alargamiento del enlace O-H del grupo hidroxilo y una banda en 2224 cm<sup>-1</sup> asignada a los alargamientos C-N del grupo nitrilo (CN) (**espectro 1, ver apéndice**). El espectro de RMN<sup>1</sup>H mostró un singlete en 3,96 ppm correspondiente a los protones del grupo metoxi (OCH<sub>3</sub>), un singlete en 6,34 ppm asignado al protón del hidroxilo (OH), se observaron tres señales a 6,99 ppm un doblete con  $J = 8,59$  Hz asignada al H<sub>5</sub>; 7,30 ppm un doblete de doblete que integra para un protón con  $J_1 = 2,20$  Hz  $J_2 = 8,59$  y asignado al H<sub>6</sub> y a 7,71 ppm un doblete con una  $J = 2,20$  Hz asignado al H<sub>2</sub> además se puede observar un singlete en 7,61 ppm correspondiente al protón olefinico característico de cada compuesto obtenido (**espectro 2**).

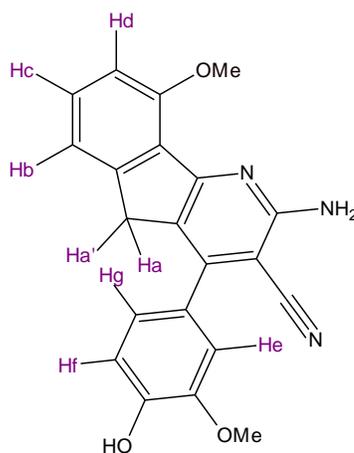
La síntesis de los derivados de núcleo 5H-indeno[1,2-b]piridina **KC2**, se realizó en una sola etapa, mediante una reacción de adición tipo Michael entre los respectivos derivados de benzilidenemalononitrilo sustituidos **KC1** previamente

obtenidos y las diferentes indanonas sustituidas (**figura 17**), con cantidades catalíticas de acetato de amonio y ácido acético en cantidades catalíticas a reflejo en etanol, **esquema de síntesis 1**. Con este procedimiento se obtuvieron los derivados indenopiridinas respectivos **KC2** en un período de tiempo de ocho a diez horas en buenos rendimientos; el sólido obtenido se recristalizó por cambio de temperatura empleando etanol como solvente. De esta manera se sintetizaron los derivados de tipo 5H-indeno[1,2-b]piridina polihidroxilados **KC2**, con rendimientos del 72-87%.



**Figura 17.** Mecanismo propuesto para la formación de los derivados del tipo 5H-indeno[1,2-b]piridina.

La estructura de los derivados del tipo 5H-indeno[1,2-b]piridina polihidroxiados obtenidos, en general, se corroboró mediante el espectro IR por la presencia de una banda alrededor de  $2230\text{-}2200\text{ cm}^{-1}$  correspondiente al grupo CN, en  $3500\text{-}3400\text{ cm}^{-1}$  asignadas a las vibraciones de alargamiento N-H de la amina primaria; confirmando la ciclación del sistema según el mecanismo propuesto (**figura 21**), aunado a la ausencia de la banda de vibración C=O del grupo carbonilo de las indanonas, los experimentos de RMN<sup>1</sup>H permitieron asignar un singlete alrededor de 3,73 ppm para el grupo metileno (CH<sub>2</sub>) del anillo indeno y un singlete ancho cerca de 6,60 ppm con una integral equivalente a dos protones correspondiente a la amina primaria (NH<sub>2</sub>). En el experimento de RMN<sup>13</sup>C se puede observar para cada derivado obtenido, una señal cerca de 34-32 ppm signada al carbono metileno, la cual se confirmó por el experimento DEPT 135, una señal alrededor de 85 ppm correspondiente al carbono cuaternario sustituido por el grupo nitrilo y cerca de 118 ppm se confirma la presencia del carbono del grupo nitrilo.

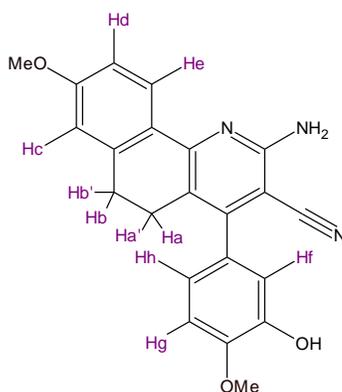


**KC2-23**

Un ejemplo de esta familia de compuestos es el derivado 2-amino-3-nitrilo-4-(3, 4, 5-trimetoxi)fenil-9-metoxi-5H-indeno[1,2-b]piridina **KC2-23**, el cual presentó en el espectro IR la banda característica a  $2224\text{ cm}^{-1}$  correspondiente a la vibración de alargamiento del grupo CN, así como una banda ancha entre  $3472\text{-}3360\text{ cm}^{-1}$  correspondientes a la vibración de alargamiento N-H del grupo amino ( $\text{NH}_2$ ) a la vibración de alargamiento O-H del grupo hidroxilado (**espectro 3**). En el espectro de  $\text{RMN}^1\text{H}$  se observó un singlete a 3,73 ppm que integra para dos protones correspondiente al grupo  $\text{CH}_2$  del indeno; dos singletes a 3,83 y 3,91 ppm que integran para tres protones respectivamente correspondientes a los sustituyentes metoxi ( $\text{OCH}_3$ ) del anillo fenil; un singlete que integra para dos protones en 6,60 ppm correspondiente a la amina primaria; también se observaron las señales correspondientes a los protones aromáticos del núcleo 5H-indeno[1,2-b]piridina, así como, los del sustituyente fenil entre 6,91-7,41 ppm, además se evidenció una señal a 9,40 ppm que integra para un protón correspondiente al sustituyente hidroxilado (OH) (**espectro 4**). En el espectro de  $\text{RMN}^{13}\text{C}$  se puede corroborar la presencia de la señal correspondiente al grupo  $\text{CH}_2$  del indeno en 34,03 ppm, así como dos señales a 56 ppm correspondiente a los carbonos del grupo metoxi, una señal en 85,40 ppm asignada al carbono carbono cuaternario sustituido por el grupo CN, también se observó la presencia del carbono del grupo nitrilo en 118,59 ppm (**espectro 5**).

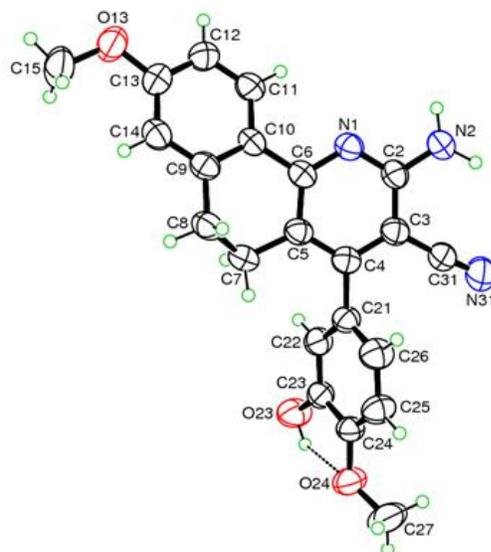
Por otro lado, se realizó la síntesis de los derivados polihidroxilados del núcleo 5,6-dihidrobenzo[h]quinolina **KC3** por una reacción en un solo paso preparada de forma análoga a los derivados **KC2**, a partir de los bencilidenemalononitrilo

**KC1** previamente sintetizados y las respectivas tetralonas sustituidas, con rendimientos del 80-90%, **esquema de síntesis 2**. Los derivados dihidrobenzoquinolinas respectivos se obtuvieron mediante este procedimiento en períodos de tiempo de seis a ocho horas como un sólido precipitado al enfriar el medio de reacción, que luego fue recristalizado por gradiente de temperatura en etanol. Dichas estructuras se corroboraron en el espectro de IR por la presencia de una banda entre 3500-3400  $\text{cm}^{-1}$  asignadas a las vibraciones de alargamiento N-H de la amina primaria y una banda alrededor de 2230-2200  $\text{cm}^{-1}$  correspondiente al grupo CN, en el experimento de RMN<sup>1</sup>H por la presencia de dos multipletes cerca de 2,49-2,72 ppm asignados a los dos grupos CH<sub>2</sub> del anillo tetralona, un singlete ancho a 6,61 ppm con una integral equivalente a dos protones correspondiente al grupo NH<sub>2</sub>. En el experimento de RMN<sup>13</sup>C se observó la presencia de los metileno de la tetralona por la presencia de dos bandas entre 29 y 25 ppm, los cuales se confirmaron en un experimento DEPT 135, también se puede evidenciar la señal correspondiente al carbono cuaternario sustituido por el grupo CN alrededor de 88 ppm, así como el grupo nitrilo por la presencia de una señal cerca de 118 ppm.



**KC3-58**

Un ejemplo de esta familia de compuestos es el 2-amino-3-nitrilo-4-(3-hidroxi-4-metoxi)fenil-8-metoxi-5,6-dihidrobenzo[h]quinolina **KC3-58**, el cual presentó en el IR una banda ancha entre 3440-3344  $\text{cm}^{-1}$  correspondiente a la amina primaria y al grupo hidoxi (OH), y en 2224  $\text{cm}^{-1}$  correspondiente al grupo CN (**espectro 6**). El espectro de  $\text{RMN}^1\text{H}$  mostró dos multipletes entre 2,72-2,49 ppm correspondiente a los protones  $\text{H}_a$  y  $\text{H}_b$  de los dos metenos del anillo tetraleno; dos singletes a 3,80 y 3,83 ppm correspondientes a tres protones de cada grupo metoxi; un singlete ancho a 6,61 ppm correspondiente a los dos protones del grupo amino primario; también se observaron las señales correspondientes a los protones aromáticos del núcleo 5,6-dihidrobenzo[h]quinolina, así como, los del sustituyente fenil entre 6,74-8,08 respectivamente correspondientes al patrón de sustitución de este derivado; y se observó un singlete a 9,28 ppm que integraba para un protón correspondiente al grupo hidoxi (**espectro 7**). En el espectro de  $\text{RMN}^{13}\text{C}$  se puede observar la presencia de la señal correspondiente a los grupos  $\text{CH}_2$  del tetraleno entre 24,57-28,34 ppm, la cual se corroboró mediante el experimento DEPT 135, también se observó una señal alrededor de 88 ppm asignada al carbono cuaternario sustituido por el grupo CN, y una señal cerca de 118 ppm correspondiente al grupo CN (**espectro 8**). Estos datos fueron luego verificados por la obtención de la estructura cristalina de este derivado (**figura 18**), en el cual se evidencio que el sustituyente fenil en posición 4 se coloca casi perpendicular con respecto al núcleo dihidrobenzoquinolina, **tabla II**.



**Figura 18.** Estructura cristalina de los derivados polihidroxiados del núcleo 5,6-dihidrobenzo[h]quinolina **KC3-58**.

**Tabla II.** Datos cristalográficos del compuesto KC2-58.

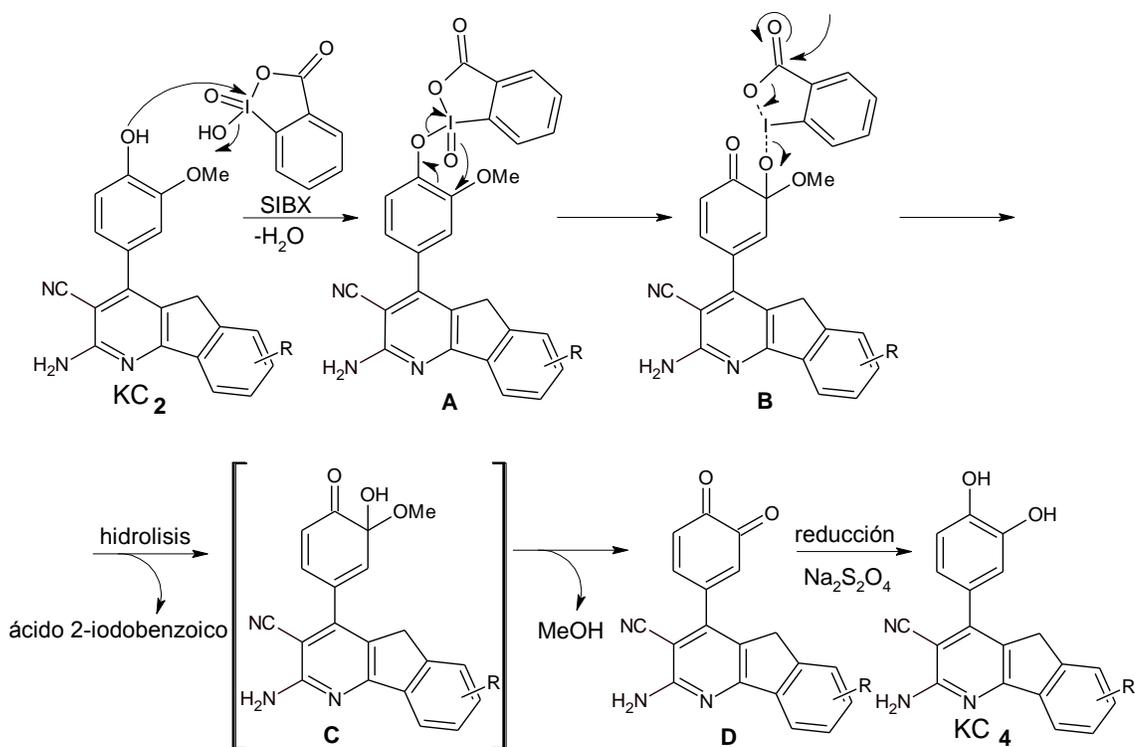
| <i>Crystal Data</i>                      |   |
|--|---|
| <b>Formula</b>                           | <b>C<sub>22</sub>H<sub>19</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub> · 0.5 C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>O</b> |
| <b>MW</b>                                | <b>403.84</b>   |
| <b>Colour</b>                            | <b>yellow</b>   |
| <b>Morphology</b>                        | <b>prism</b>  |
| <b>Specimen size (mm)</b>                | <b>0.28x0.13x0.09</b>   |
| <b>T (K)</b>                             | <b>295(2)</b>   |
| <b>a (Å)</b>                             | <b>16.361(4)</b>  |
| <b>b (Å)</b>                             | <b>7.8450(16)</b>   |
| <b>c (Å)</b>                             | <b>31.540(7)</b>  |
| <b>β (°)</b>                             | <b>101.128(4)</b>   |
| <b>V (Å<sup>3</sup>)</b>                 | <b>3972.1(15)</b>   |
| <b>Crystal system</b>                    | <b>monoclinic</b>   |
| <b>Space group (No.)</b>                 | <b>C2/c (No. 15)</b>  |
| <b>Z</b>                                 | <b>8</b>  |
| <b>D<sub>c</sub> (g cm<sup>-3</sup>)</b> | <b>1.326</b>  |
| <b>F(000)</b>                            | <b>1672</b>   |
| <b>μ(Mo-Kα) (mm<sup>-1</sup>)</b>        | <b>0.091</b>  |
| <b>θ range (°) for cell</b>              | <b>2.5-27.6</b>   |
| <b>No. refls. for cell</b>               | <b>625</b>  |

| <i>Data Collection</i>                               |                |
|--|----------------|
| $\theta$ range (°)                                   | 2.5-27.7       |
| h range  | -20, 19        |
| k range  | -10, 10        |
| l range  | -40, 38        |
| Mean $\Delta I$ for checks (%)                       | <0.1           |
| No. refls. measured                                  | 23189          |
| No. refls. unique                                    | 3916           |
| No. refls. $I > 2\sigma(I)$                          | 1822           |
| Abs. correction                                      | multi-scan     |
| Trans. coeff. ( $T_{\min}$ , $T_{\max}$ )            | 0.981-0.990    |
| $R_{\text{int}}$                                     | 0.0994         |
| <i>Refinement (last cycle)</i>                       |                |
| Weighting scheme (a,b)                               | 0.0780, 1.3479 |
| No. params. refined                                  | 266            |
| R1 [ $I > 2\sigma(I)$ ]                              | 0.0753         |
| R1 (all data)  | 0.1877         |
| wR2 [ $I > 2\sigma(I)$ ]                             | 0.1533         |
| wR2 (all data)                                       | 0.1986         |
| S (g.o.f.) (all data)                                | 1.039          |
| $\Delta/\sigma$ max.                                 | 0.004          |
| $\Delta/\sigma$ mean                                 | <0.0005        |
| $\Delta\rho_r$ (min., max.) ( $e \text{ \AA}^{-3}$ ) | -0.25, 0.22    |

Una vez obtenidos los derivados 5H-indeno[1,2-b]piridina, nos avocamos a la síntesis de los derivados de este núcleo polihidroxiados **KC4**, por una reacción de *Orto*-demetilación oxidativa mediada por el ácido 2-iodoxibenzoico estabilizado (SIBX), **esquema de síntesis 3**.

El SIBX es un agente oxidante *Orto*-selectivo disponible comercialmente, empleado en la demetilación de 2-metoxifenoles. Por ello, se esperaba que un arenol de tipo **KC2** reaccionara con el SIBX, presumiblemente a través de un paso inicial de intercambio de ligando con eliminación de agua, para dar el ariloxi-iodado tipo **A**, esta especie podría reorganizarse para formar luego un enlace simple oxígeno-carbono y generar la especie **B**, que posteriormente por

hidrolisis da el producto hemiacetal **C**, que luego elimina metanol para proporcionar **D**, y posiblemente por la adición de un agente reductor al finalizar la reacción se genere su análogo catecol **KC4** (figura 19), de acuerdo con lo reportado en la literatura.<sup>62</sup>



**Figura 19.** Posible mecanismo del SIBX mediante la *ortho*-demetilación oxidativa selectiva de arenoles sustituidos.

Entonces, con el fin de obtener los correspondientes catecoles de los derivados 2-metoxifenoles indenopiridina se ensayaron diferentes condiciones de reacción empleando SIBX como agente oxidante, **tabla III**.

**Tabla III.** Condiciones de reacción empleadas para la obtención de los indenopiranos polihidroxilados.

| Solvente     | SIBX:COMPUESTO |     | Tiempo (h)         |
|--------------|----------------|-----|--------------------|
| Acetona/agua | 1,1:1          | 2:1 | 6; 12; 24; 48 y 72 |
| etanol       | 1,1:1          | 2:1 | 6; 12; 24; 48 y 72 |
| THF          | 1,1:1          | 2:1 | 6; 12; 24; 48 y 72 |

El tratamiento de los derivados 2-metoxifenol indenopiridina en tetrahidrofurano, acetona/agua y etanol como solventes y 1,1 o 2 equivalentes de SIBX a temperatura ambiente, durante 6, 12, 24, 48 y 72 horas, seguido de la adición de una solución fresca de ditionita de sodio ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ ) como agente reductor para finalizar la reacción, y así obtener los respectivos catecoles, no fue posible. La ausencia del producto catecol puede ser el resultado de la desactivación de la función fenol por el efecto atractor de electrones del anillo de piridina, así como del sustituyente nitrilo sobre el anillo.<sup>62</sup>

Debido a este resultado negativo se procedió a continuar con el siguiente paso planteado en la ruta de síntesis propuesta para demetilar los grupos metoxi.

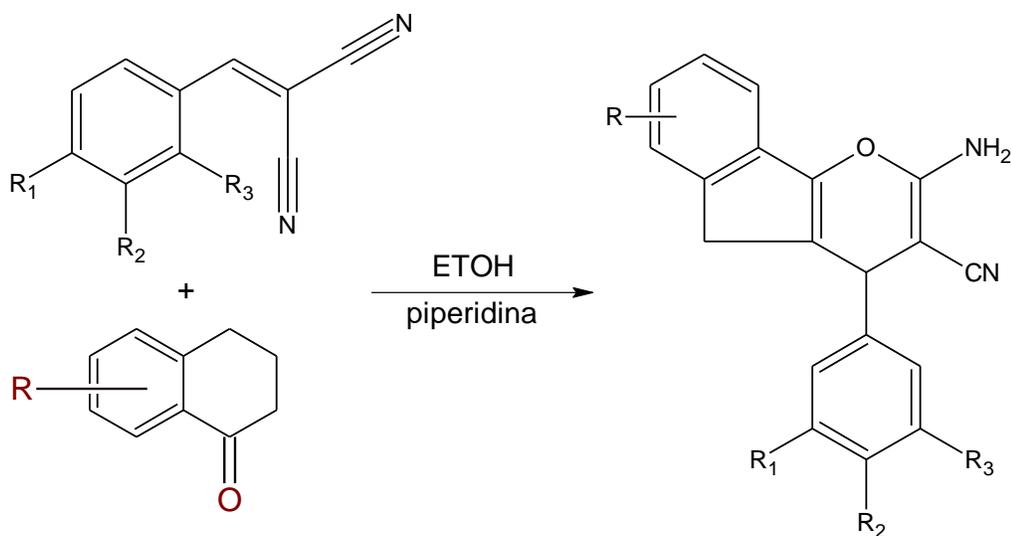
La segunda ruta planteada para la obtención de los derivados 5H-indeno[1,2-b]piridina polihidroxilados, consiste en una reacción de demetilación oxidativa no selectiva empleando ácido bromhídrico como agente oxidante, **esquema de síntesis 4**. La reacción se llevó a cabo calentando a la temperatura de

ebullición del ácido bromhídrico al 48% acuoso por tiempos desde 5, 12, 24, y 72 horas, obteniendo resultados poco favorables.

La reacción se siguió por cromatografía de capa fina, evidenciando la formación de un producto diferente al material de partida, pero difícil de purificar y por ende de caracterizar.

En vista, de los resultados obtenidos se decidió pasar a la siguiente ruta de síntesis planteada en nuestro esquema de síntesis para la obtención de los derivados 4,5-dihidroindeno[1,2-b]pirano. Los intermediarios claves para la obtención de estos compuestos son los derivados bencilidenemalononitrilo **KC1** previamente sintetizados.

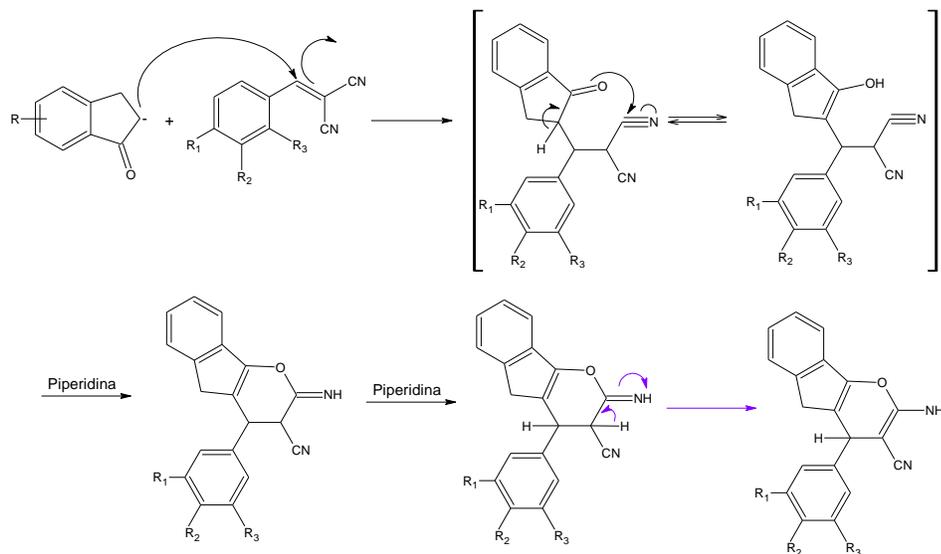
En la literatura, existen varios reportes que describen la síntesis de derivados benzocromenos por la adición Michael de bencilidinemalononitrilo a aril-1-tetralona (**figura 20**).<sup>63-65</sup>



**Figura 20.** Síntesis de derivados Benzocromenos

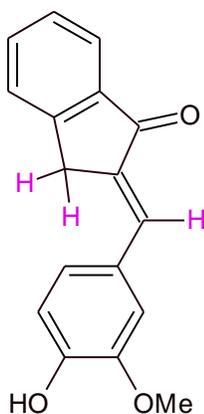
En vista, de las analogías encontradas en la literatura entre los compuestos de partida utilizados para obtener los indenopiranos y los empleados en la obtención de los benzocromenos, se propuso que los derivados de tipo indanonas sustituidos podrían experimentar una reacción de adición tipo Michael (**figura 25**). Por lo cual, nuestro grupo de investigación refirió la síntesis de los derivados 4,5-dihidroindeno[1,2-b]pirano, a este mismo método, utilizando como material de partida los bencilidenemalononitrilos y las indanonas respectivas, **esquema de síntesis 5**.

La síntesis de estos heterociclos se plantea inicialmente por la adición de los derivados bencilidenemalononitrilos sustituidos **KC1** a las diferentes indanonas sustituidas, en presencia de etanol como solvente y 0,05 mL de piridina en cantidades catalíticas a temperatura de reflujo en etanol por al menos seis horas.

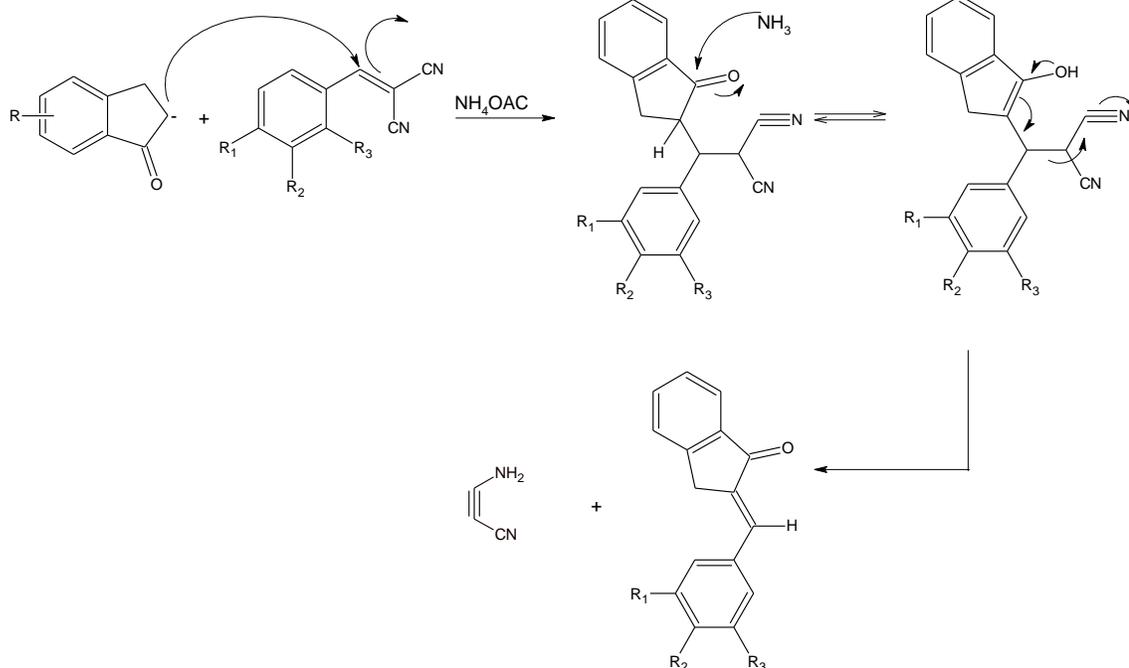


**Figura 21.** Mecanismo propuesto para la formación de los derivados 4,5-dihidroindeno[1,2-b]pirano.

Los resultados obtenidos bajo estas condiciones de reacción no fueron satisfactorios, el sólido obtenido luego de ser purificado por recristalización en etanol como solvente, se caracterizó por espectroscopia IR mostrando la presencia de una banda en  $1676\text{ cm}^{-1}$  correspondiente a un grupo carbonilo y la ausencia de la señal correspondiente a las vibraciones C-N del grupo nitrilo y N-H del grupo amino (**espectro 9**), estos datos se corroboraron por el experimento de RMN<sup>1</sup>H por la ausencia de un singlete ancho correspondiente al grupo amina primaria y por la presencia de un doblete a 4 ppm con  $J= 1,97\text{ Hz}$  característico del acoplamiento entre un protón olefínico de una cetona  $\alpha, \beta$ -insaturada y el metileno ( $\text{CH}_2$ ) de la indanona (**espectro 10**), lo que nos llevó a proponer, la estructura que a continuación se describe:



Se puede sugerir una explicación para la formación de este producto al observar el mecanismo propuesto para la obtención de una cetona  $\alpha, \beta$ -insaturada bajo estas condiciones de reacción (**figura 22**).



**Figura 22.** Mecanismo propuesto para la formación de una cetona  $\alpha, \beta$ -insaturada.

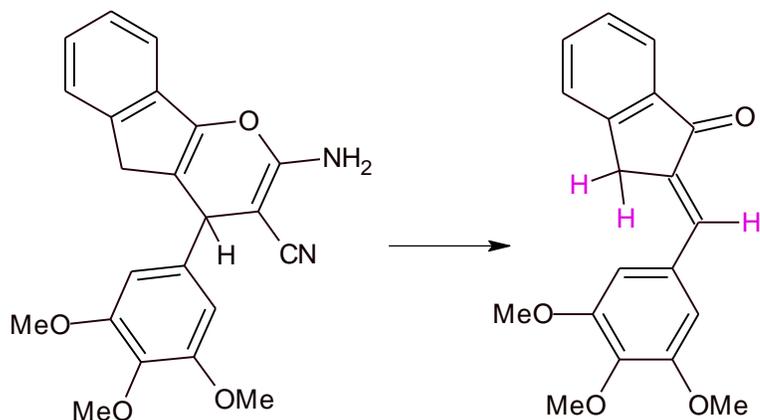
En busca de cumplir con los objetivos planteados, se procedió a estudiar las condiciones de esta reacción, variando primero el volumen de base añadida desde 0,01 a 0,05 mL; luego cambiando la temperatura de reflujo a temperatura ambiente y por último cambiamos el solvente de etanol a benceno.

El único cambio importante se observó al variar el volumen de piperidina añadido al medio de reacción. Con la adición de 0,02 a 0,05 mL de base el resultado obtenido fue la estructura abierta mencionada anteriormente. Pero, al adicionar 0,01 mL de piperidina el sólido obtenido se correspondió a una mezcla de la estructura abierta más el producto indenopirano sustituido respectivo. Durante el curso de la reacción se observó que la estructura abierta se comenzaba a formar a los treinta minutos de tiempo de reacción, así como,

también se evidenció por TLC la formación del núcleo indenopirano deseado, ambos con  $r_f$  similares, además de material de partida sin reaccionar. A medida que aumenta el tiempo de reacción esperando que se consuma todo el material de partida, se obtiene una mayor proporción del compuesto abierto.

Esta mezcla de compuestos se confirmó mediante el espectro IR por la presencia de dos bandas en  $3456-3360\text{ cm}^{-1}$  correspondiente a una amina primaria, una banda en  $2224\text{ cm}^{-1}$  correspondiente al grupo CN y una banda en  $1660\text{ cm}^{-1}$  correspondiente al grupo carbonilo de la estructura sin ciclar (**espectro 11**); en el experimento de  $\text{RMN}^1\text{H}$  se observó un singlete ancho en 5,27 ppm ( $\text{NH}_2$ ), un singlete en 3,89 ppm correspondiente al protón sobre el carbono quiral del anillo pirano que se forma al ciclar la molécula y un doblete en 4,03 ppm con una  $J= 1,97\text{ Hz}$  característico del acoplamiento entre el protón olefínico de la cetona  $\alpha, \beta$ -insaturada y el metileno ( $\text{CH}_2$ ) de la indanona (**espectro 12**), y en el experimento de  $\text{RMN}^{13}\text{C}$  se corroboró la presencia de la estructura abierta por la presencia de una señal en 193,94 ppm correspondiente al grupo carbonilo, una señal asignada a los carbonos de los grupos metileno del tetraleno y una señal correspondiente al carbono quiral del anillo pirano, los cuales se confirmaron mediante un experimento DEPT 135 (**espectro 13**),.

En base a estas evidencias, podemos proponer la existencia de una posible reacción hacia la formación de la estructura abierta desde la estructura cerrada, como el siguiente:



A pesar de todos los intentos realizados, no fue posible cumplir con este objetivo, los resultados obtenidos nos conducen a pensar que el producto deseado de núcleo indenopirano se degrada hacia el producto abierto cetona  $\alpha$ ,  $\beta$ -insaturada, posiblemente, por la contracción de un anillo de seis miembros a un anillo de cinco miembros, como las indanonas sustituidas respectivas empleadas como producto de partida en este trabajo, lo que conlleva a generar un sistema heterociclo fusionado de mayor tensión, que podría provocar una alta inestabilidad al producto final, por ello lo competitivo de la reacción hacia la formación de la estructura abierta.<sup>63-65</sup>

En vista de estos resultados, no se pudo llevar a cabo el **esquema de síntesis 6.**

## 3.2. Sección Biológica

### 3.2.1. Actividad citotóxica-antitumoral

La nueva serie de derivados KC obtenidos fueron probados por su capacidad de inhibir la viabilidad de las líneas celulares de cáncer de próstata (PCa) humanas y murinas PC-3 (cáncer de próstata avanzado independiente de andrógeno), LNCaP (células de un adenocarcinoma de próstata humano sensibles a andrógeno) y MatLyLu (cáncer de próstata de células tumorales derivada de rata). Los resultados se resumen en la **tabla IV**. De un total de seis compuestos, cinco fueron citotóxicos (concentración inhibitoria 50,  $CI_{50} < 100$   $\mu\text{g/mL}$ ), inhibiendo la viabilidad celular de PC-3, LNCaP y MatLyLu, y el compuesto más activo (**KC3-15**) también lo fue en las células de próstata no tumorales (HPB-1), sin embargo, mostrará un índice de seguridad mayor al de los otros cinco derivados.

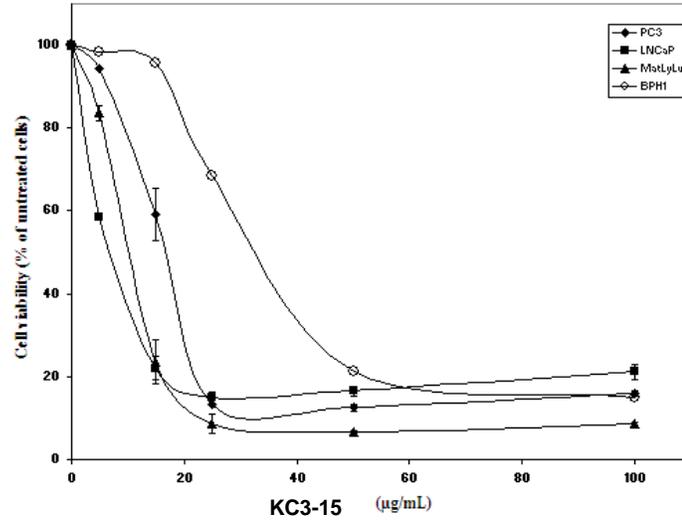
De acuerdo con estos resultados podemos inferir que; la actividad inhibitoria de los derivados KC3 está fuertemente influenciada por la posición del sustituyente metoxi en el nucleo benzoquinolina y la presencia de un grupo hidroxilo en la posición 4 del anillo fenil. En lo que respecto al grupo de compuestos KC2 la disminución de la actividad pudiese estar relacionada también con la sustitución del anillo.

**Tabla IV.** Efecto citotóxico de los derivados KC sobre células de tumor de próstata y células no tumorales.

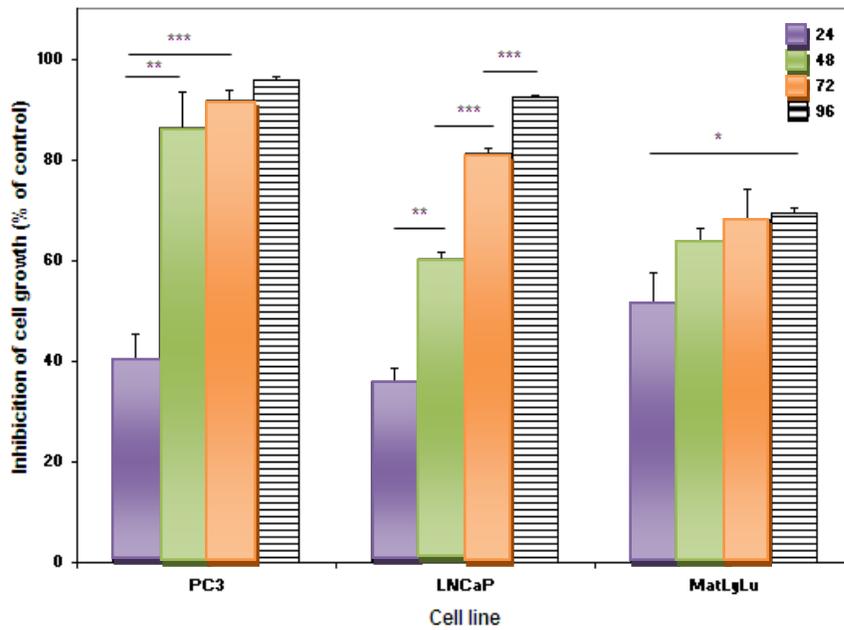
| Compuesto | PC-3         | LNCaP        | MatLylu      | BPH-1        |
|-----------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| KC2-5     | >100         | >100         | >100         | >100         |
| KC2-16    | 46,37 ± 1,54 | 53,29 ± 1,18 | 51,08 ± 0,77 | 78,45 ± 1,63 |
| KC3-15    | 14,7 ± 0,88  | 7,06 ± 0,01  | 8,11 ± 0,43  | 34,96 ± 0,09 |
| KC3-17    | 35,33 ± 0,39 | 29,84 ± 1,90 | 30,25 ±      | 72,36 ± 0,44 |
| KC3-18    | 28,37 ± 0,36 | 39,16 ± 0,05 | 27,52 ±      | 30,11 ± 0,12 |
| KC3-19    | 68,37 ± 0,04 | 90,07 ± 0,62 | >100         | >100         |

Los resultados se expresan como la media ± SEM de la concentración media inhibitoria o  $CI_{50}$  ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Cada experimento se realizó tres veces en cinco diferentes pozos. Significancias: \*  $p < 0,05$ , \*\*\*  $p < 0,001$  en comparación con las células HBP-1 tratadas con los compuestos.

El efecto del compuesto más activo (**KC3-15**) sobre la viabilidad celular mostró una respuesta dependiente de la dosis en todas las líneas celulares estudiadas, con inhibición de la viabilidad a partir de  $5\mu\text{g}/\text{ml}$ . También se observa la especificidad de esta estructura a las células tumorales (**gráfico 3**). La actividad de este compuesto sigue también un efecto tiempo-dependiente a su concentración citotóxica  $CI_{50}$  (**gráfico 4**).

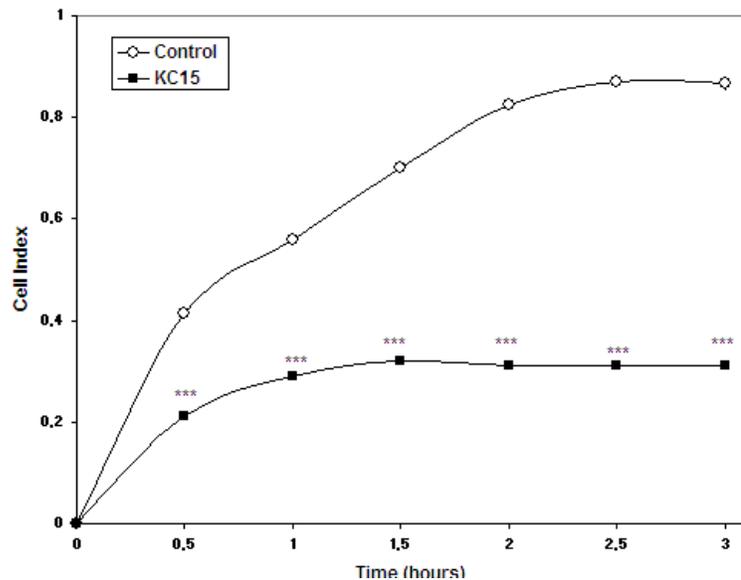


**Gráfico 3.** Curvas dosis-respuesta de PC-3, LNCaP, MatLyLu and BHP-1 tratadas con KC3-15. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SEM de tres experimentos diferentes. Cada experimento se realizó en cinco diferentes pozos.



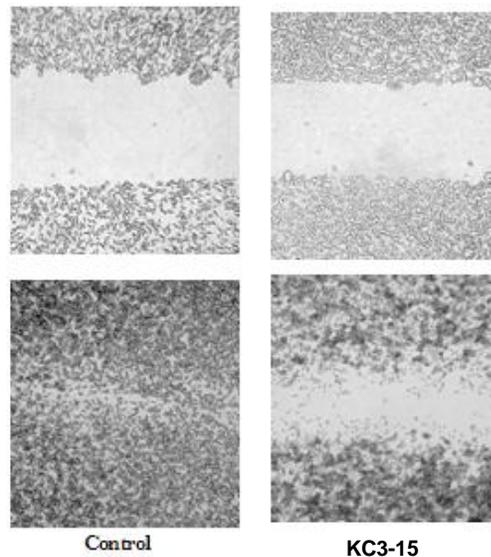
**Gráfico 4.** Efecto tiempo-respuesta de KC3-15 a su concentración citotóxica IC<sub>50</sub> sobre el crecimiento de celular de PC-3, LNCaP y MatLyLu. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SEM. Significancias: \* p < 0,05; \*\* p < 0,01 y \*\*\* p < 0,001.

El compuesto más activo **KC3-15** también, demostró afectar la adhesión, la difusión, la migración y la invasión de las células de CaP. Como se muestra en el **gráfico 5**, **KC3-15** inhibe la adhesión celular y la difusión en su concentración citotóxica  $CI_{50}$ , ya que el índice de células se redujo en comparación con el vehículo control. Las mediciones se realizaron en el analizador celular en tiempo real xCELLigence. Estos resultados demuestran claramente el grado de adhesión celular y difusión en 0-3 h, demostrando que el compuesto es inhibidor de la adhesión celular.

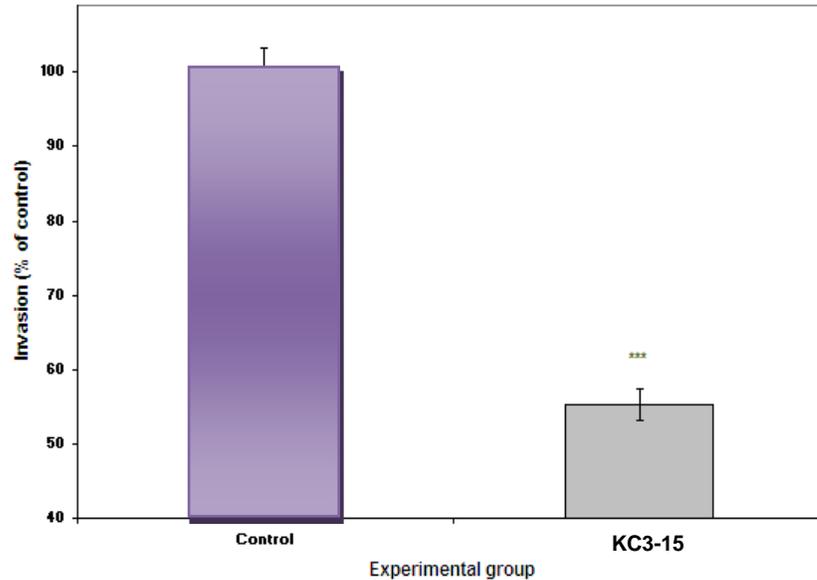


**Gráfico 5.** Efecto de **KC3-15** sobre la adhesión y difusión celular. Las células PC3 fueron incubadas con el compuesto a su  $CI_{50}$  citotóxica. Las células fueron aplicadas por triplicado sobre la cubierta de sensores de fibronectina (FN), y su adhesión y difusión fueron cuantificadas por sensores electrónicos celulares en tiempo real como los valores de índice celular (IC). Medio DMSO (0,2%) sólo sirvió como control (vehículo). Los resultados representan la media  $\pm$  SEM de tres experimentos independientes. Significancias: \*\*\*  $p < 0.01$  en comparación con el vehículo control.

Para examinar el efecto de este compuesto sobre las propiedades de migración de las células tumorales, se utilizó el ensayo de cicatrización de la herida. El cultivo de células PC-3 libre de compuesto como control, en gran parte mostró una recuperación de la herida en 24 horas (**figura 23**). Por otro lado, los resultados del ensayo de invasión celular utilizando la cámara de Boyden recubierta con Matrigel revelaron que **KC3-15** también disminuyó significativamente la invasión de celular de LNCaP después de 18 h (**Gráfico 6**).



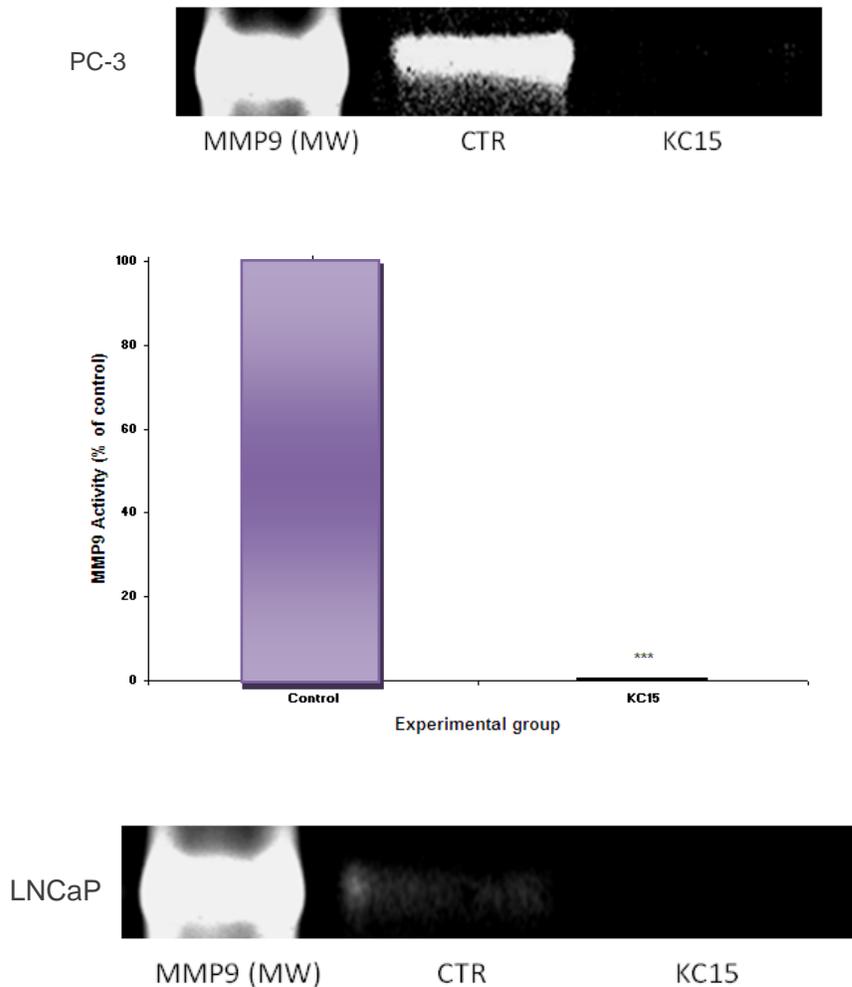
**Figura 23.** Efecto de KC3-15 en el cierre de la herida de PC-3 en un modelo de una sola herida. Imágenes representativas de células PC-3 fueron capturadas en el momento de la herida y 24 horas después de la raspadura para ilustrar la recuperación de la herida. Las imágenes presentadas son de un experimento representativo realizado de forma independiente en tres ocasiones.



**Gráfico 6.** Efecto de **KC3-15** en la invasión de las células LNCaP. Las células tratadas con **KC3-15** o el vehículo fueron sembradas en un Matrigel recubierto de una membrana de 0,8  $\mu\text{m}$  de poro durante 18 h, y la inhibición de la invasión en relación con el vehículo control de las células tratadas fue determinada. Los resultados representan la media  $\pm$  SEM de tres experimentos independientes. Significancias: \*\*\*  $p < 0.01$  en comparación con el vehículo control.

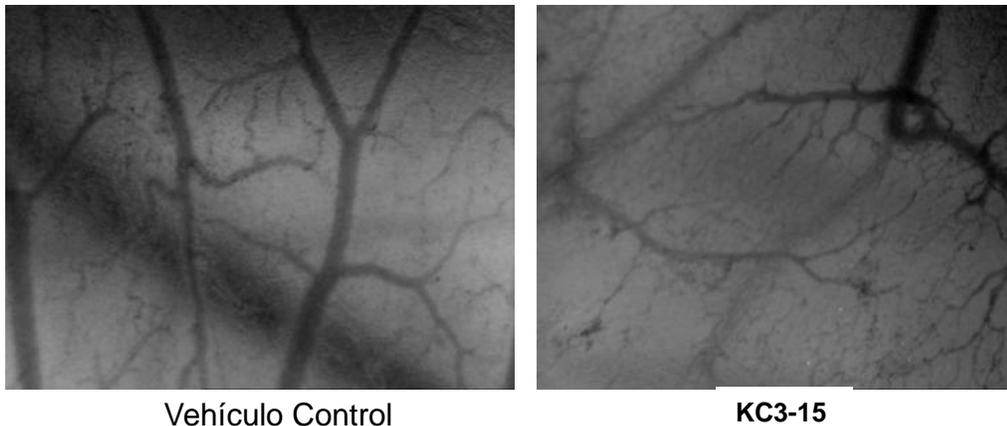
Como ya se sabe, las proteínas de la matriz extracelular juegan un papel importante durante la adhesión, migración, invasión y angiogénesis. En este contexto, la adhesión celular, la migración y la invasión representan un proceso celular multipaso en el cual el mayor papel lo juega la proteólisis de los componentes de la matriz extracelular por la MMPs en cáncer. En particular, la expresión y actividad proteolítica de, MMP-2 y MMP-9 está bien correlacionada con la progresión y el grado de malignidad, ya que contribuyen a la invasión y metástasis de las células cancerosas por degradación del colágeno tipo IV, el cual es el mayor componente de la membrana basal. Razón por la cual, se investigó el efecto de **KC3-15** sobre las MMP-9 Y MMP-2, resultando este

compuesto decrecer la actividad de la MMP-9 en las células de PCa PC-3 y LNCaP (**figura 24**). No se pudo detectar ninguna actividad de MMP-2 en las dos líneas celulares ensayadas.



**Figura 24.** La actividad de las metaloproteinasas MMP-9 por zymography de gelatina en células PC-3 y LNCaP cuando se exponen a **KC3-15** durante 24 horas. Solamente el resultado en células PC-3 se ha cuantificado en relación con el vehículo control y se presentan como la media  $\pm$  SEM del porcentaje de actividad en tres experimentos diferentes. Significancia: \*\*\*  $p < 0,001$  en comparación con el vehículo control.

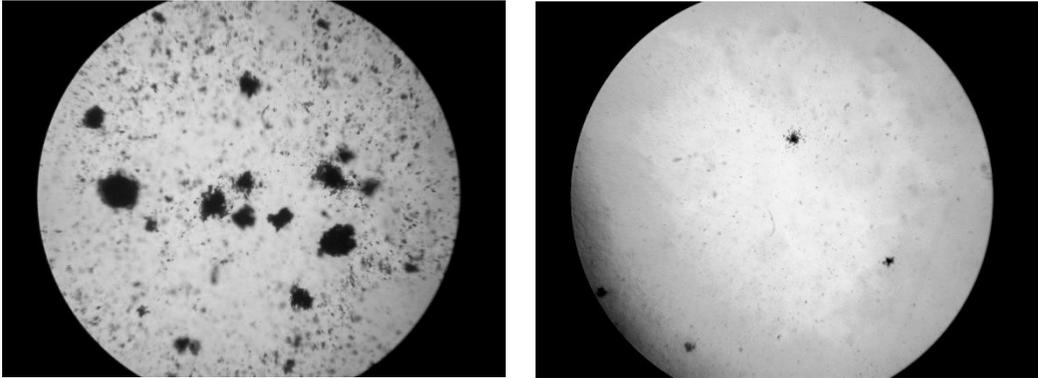
**KC3-15** es capaz de inhibir el proceso de angiogénesis del tumor. Este efecto se examinó por medio del ensayo de angiogénesis de la membrana coriolaroidea de pollo (CMA). Los resultados mostraron una red vascular regular que consiste de un plexo capilar continuamente perfusionado del control CAMs, fue degenerada por **KC3-15**. Las áreas no perfusionadas y los cambios en la ramificación del pequeño suministro de vasos son característicos de estas alteraciones, sugiriendo la potencial propiedad antiangiogénica de este derivado (figura 25).



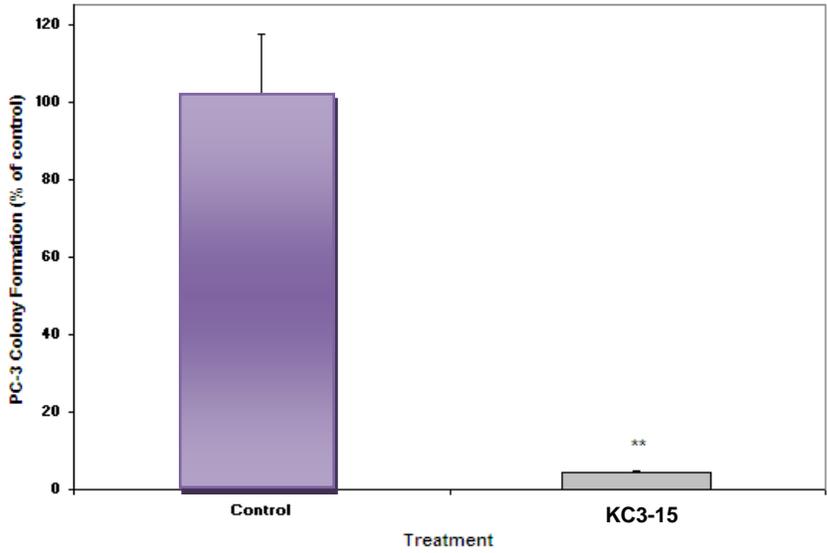
**Figura 25.** Degeneración de los vasos sanguíneos de CAM por tratamiento con **KC3-15**. Las imágenes muestran la CAM de pollo en el día 13 de desarrollo, tratada sólo con vehículo o con **KC3-15** (14,7  $\mu\text{g} / \text{mL}$ ) durante 72 horas. En el control de CAM, la red vascular consiste en un plexo capilar continuamente perfusionado y que irriga los vasos. Los vasos están dispuestos simétricamente. **KC3-15** induce la degeneración de la red vascular mostrando áreas no perfusionadas y cambios en la ramificación de los vasos pequeños. Los resultados representan las imágenes estándar de cinco experimentos diferentes.

**KC3-15** decrece la formación de colonias. El crecimiento independiente del anclaje se considera una prueba in vitro, que se correlaciona con la tumorigénesis en ratones desnudos. Por lo tanto, se examinó la capacidad de las células PC-3 y LNCaP a crecer en un medio de agar semiblando. El vehículo control mostró un crecimiento significativo en la formación de colonias en agar blando en el día 14 como previamente reportaron otros autores. En comparación, las células tratadas con KC15 mostraron una disminución significativa en el número y tamaño de las colonias (**figura 26**).

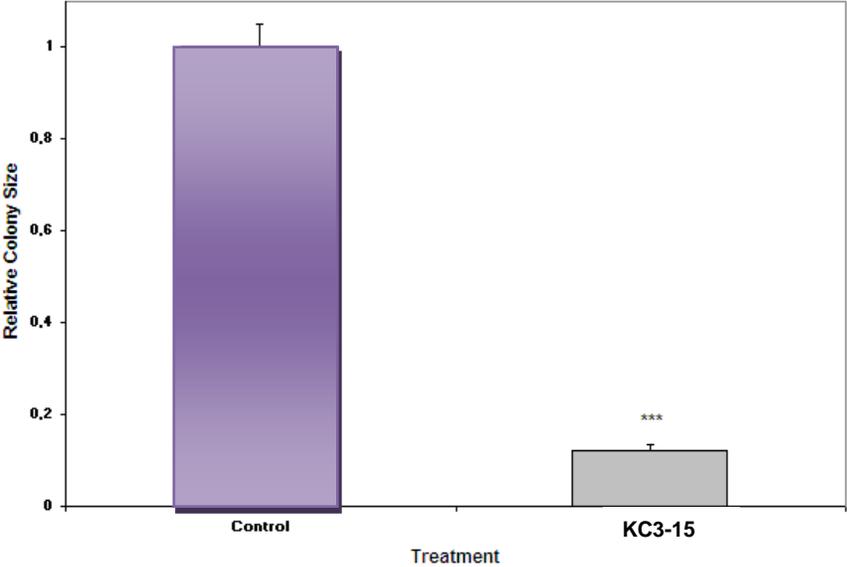
a)



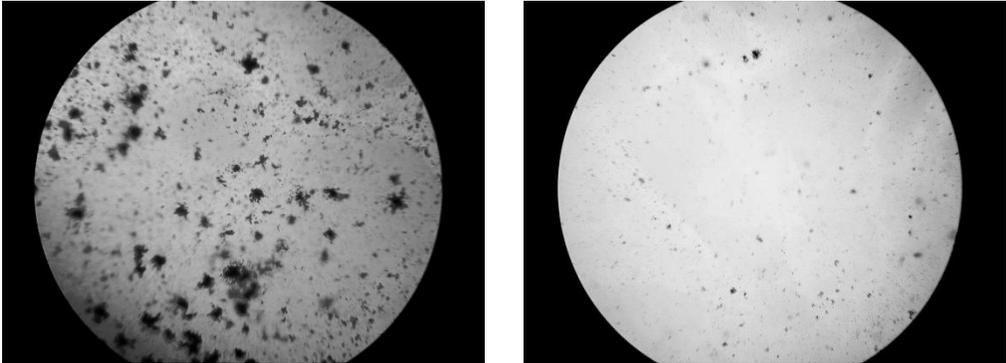
b)



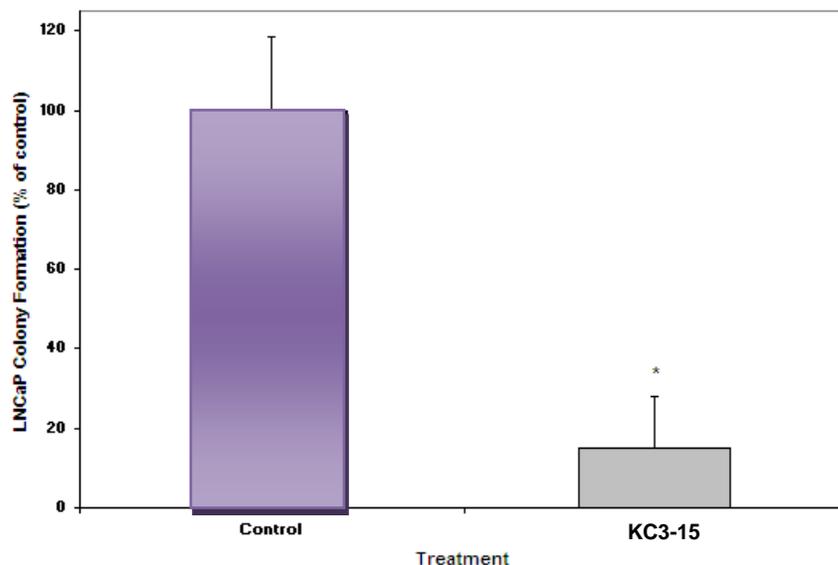
c)



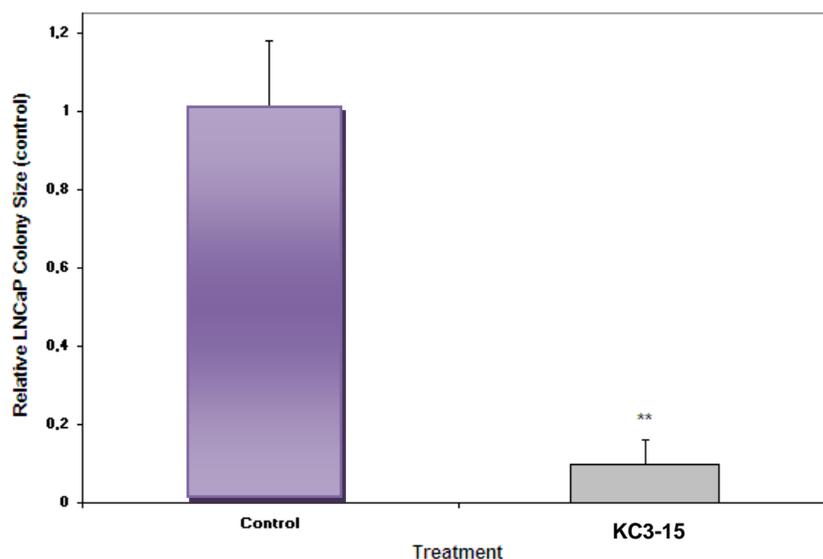
d)



e)



f)



**Figura 26.** Efecto de **KC3-15** en la formación de colonias en agar blando. Las células PC-3 (a-c) y LNCaP (d-f) se colocaron sobre una capa semisólida de agar blando, tratados con el compuesto e incubadas durante 14 días. Los resultados en a) y d) representan las imágenes estándar de tres experimentos diferentes. Los resultados fueron cuantificados en relación con el vehículo control y se representan como la media  $\pm$  SEM del porcentaje de formación de colonias (b y e) y el tamaño de la colonia relativa (c y f). \*\* p <0,01 y \*\*\* p <0,001 en comparación con el control del vehículo.

Ahora bien, para evaluar la toxicidad del compuesto **KC3-15**, se aplicó el bioensayo de toxicidad de *Artemia salina*. Los resultados muestran que KC3-15 fue menos tóxico para *Artemia salina* en comparación con las células de tumor (**tabla V**). Este menor efecto toxicológico de los compuestos fue confirmada por la medición del llamado radio de toxicidad antitumoral (TAR), que se define como el cociente de la concentración letal 50 (  $CL_{50}$ ) en el ensayo de *Artemia salina* entre la concentración de citotoxicidad antitumoral  $IC_{50}$ , la cual fue siempre superior 1, por lo tanto, las células tumorales son más sensibles al compuesto.

**Tabla V.** Efecto toxicológico de **KC3-15**.

| Compound | $LC_{50}$ ( $\mu\text{g/ml}$ ) | TAR PC3 | TAR LNCaP | TAR MatLyLu |
|----------|--------------------------------|---------|-----------|-------------|
| KC3-15   | $106.57 \pm 2.85$              | 7.25    | 15.09     | 13.14       |

$CL_{50}$  representa la concentración media de lisis en el ensayo de lisis de glóbulos rojos y la mitad de la concentración letal en el ensayo de *Artemia salina*, respectivamente. El radio de toxicidad antitumoral (TAR) se define por el valor resultante de la  $CL_{50}$  dividida por el valor  $IC_{50}$  correspondiente al compuesto para las células PC-3, LNCaP o MatLyLu.

### 3.2.2. Actividad antichagásica

La nueva serie de derivados KC sintetizados fueron probados in vitro contra las formas sanguíneas de tripomastigote de *T. cruzi* por su capacidad de producir la lisis de los flagelados. Los resultados se resumen en la **tabla V y VI**.

La **tabla VI** presenta los resultados del ensayo de la actividad tripanocida de los derivados KC sobre tripomastigotes sanguíneos de *Trypanosoma cruzi* en la cepa NINOA sensible a nifurtimox y benznidazol, de un total de doce compuestos, nueve fueron activos. En este caso, **KC2-16** y **KC3-17** exhiben una actividad más alta que Nifurtimox y Benznidazol (fármacos de referencia). Debido a la baja solubilidad de los derivados KC en el vehículo (DMSO /agua 01:99), su actividad decrece a medida que aumenta la concentración del compuesto, posiblemente a que a mayores concentraciones se produce una precipitación de los mismos.

La **tabla VII** presenta los resultados del ensayo de la actividad tripanocida de los derivados KC sobre tripomastigotes sanguíneos de *Trypanosoma cruzi* en la cepa INC-5, la cual es resistente a benznidazol y nifurtimox. En este caso, de un total de doce compuestos sólo ocho presentan actividad a su más baja concentración (5 µg/mL), observando que solo cuatro compuestos tienen una actividad superior al 20 %, a diferencia de los fármacos usados como controles que no presentan actividad frente a la cepa INC-5 resistente.

**Tabla VI.** Actividad tripanocida in vitro de compuestos experimentales sobre tripomastigotes sanguíneos de *Trypanosoma cruzi* cepa NINOA (% lisis).

| Compuesto     | Concentración (mg/mL) |      |      |      |
|---------------|-----------------------|------|------|------|
|               | 5                     | 10   | 50   | 100  |
| <b>NFM</b>    | 18.3                  | 31   | 37.5 | 43.7 |
| <b>BZN</b>    | 23.3                  | 33.6 | 35.9 | 40.6 |
| <b>KC2-5</b>  | 28.7                  | 29.7 | 29.9 | 35.3 |
| <b>KC3-6</b>  | 0                     | 0    | 0    | 0    |
| <b>KC3-7</b>  | 0                     | 0    | 0    | 0    |
| <b>KC3-8</b>  | 0                     | 0    | 14   | 16   |
| <b>KC3-15</b> | 35.5                  | 39.2 | 39.9 | 40.1 |
| <b>KC2-16</b> | 40.1                  | 44.4 | 24.6 | 27.9 |
| <b>KC3-17</b> | 42.1                  | 44.2 | 37.5 | 35.5 |
| <b>KC3-18</b> | 33.3                  | 33.5 | 18.3 | 19   |
| <b>KC3-19</b> | 31.3                  | 35.7 | 28.6 | 29.5 |
| <b>KC2-23</b> | 22                    | 25.8 | 32.9 | 35.8 |
| <b>KC2-26</b> | 36.5                  | 37.9 | 45   | 58.3 |
| <b>KC2-29</b> | 21.6                  | 25.6 | 28.2 | 29.9 |

Los porcentajes de lisis son el promedio de 3 determinaciones. Nifurtimox (NTZ) y Benznidazol (BZN) fueron usados como control positivo. La actividad tripanosomicida se expresa en función del porcentaje de lisis de los flagelados después del tiempo de incubación en comparación con el grupo control.

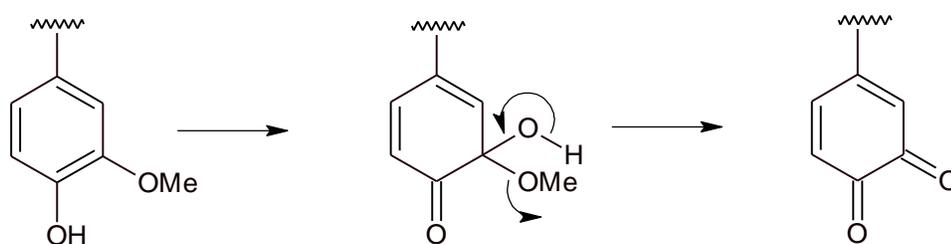
**Tabla VII.** Actividad tripanocida in vitro de los derivados KC sobre tripomastigotes sanguíneos de *Trypanosoma cruzi* cepa INC-5 (% lisis).

| Compuesto     | Concentración (µg/mL) |      |      |      |
|---------------|-----------------------|------|------|------|
|               | 5                     | 10   | 50   | 100  |
| <b>NTZ</b>    | 0                     | 20   | 30   | 38   |
| <b>BZN</b>    | 0                     | 5    | 15   | 33   |
| <b>KC2-5</b>  | 0                     | 10   | 17   | 23   |
| <b>KC3-6</b>  | 0                     | 0    | 0    | 0    |
| <b>KC3-7</b>  | 0                     | 0    | 0    | 0    |
| <b>KC3-8</b>  | 0                     | 0    | 0    | 0    |
| <b>KC3-15</b> | 20.1                  | 21.1 | 28   | 30   |
| <b>KC2-16</b> | 18                    | 27   | 29   | 29   |
| <b>KC3-17</b> | 10                    | 27   | 30   | 30   |
| <b>KC3-18</b> | 24                    | 33   | 28   | 28   |
| <b>KC3-19</b> | 4                     | 13.7 | 14.6 | 15.8 |
| <b>KC2-23</b> | 21                    | 22   | 27   | 33   |
| <b>KC2-26</b> | 20                    | 30   | 36   | 36   |
| <b>KC2-29</b> | 15.4                  | 22   | 23   | 24   |

Los porcentajes de lisis son el promedio de 3 determinaciones. Nifurtimox (NTZ) y Benznidazol (BZN) fueron usados como control positivo. La actividad tripanosomicida se expresa en función del porcentaje de lisis de los flagelados después del tiempo de incubación en comparación con el grupo control.

De acuerdo con estos resultados podemos inferir que; la actividad tripanocida de los derivados KC está fuertemente influenciada por la posición del sustituyente metoxi en los núcleos benzoquinolina e indenopiridina, siendo los más activos los que tienen el metoxi en la posición 7 y 6 respectivamente. Por su parte, podemos inferir además, la importancia de la presencia en el anillo fenil sobre la posición 4 de estos núcleos, de un patrón de sustitución 3-metoxi-

4-hidroxi. Lo cual podría favorecer la acción de una monooxigenasa que promueva la demetilación de este grupo metóxi para conducir a la formación de una ortoquinona electrofílica; y sea esta el intermediario responsable de la actividad antichagásica, tal como ha sido propuesto para el mecanismo de acción del etopósido, en el proceso de la inhibición de la TOPII-ADN.<sup>10b</sup>



**Figura 27.** Mecanismo de la orto-quinona en el etopósido a través de una oxigenación enzimática

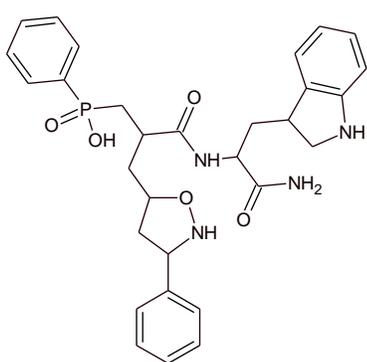
### 3.3. Sección Modelado Molecular

El conocimiento de un modelo farmacofórico de una serie de compuestos estructuralmente variables podría estar asociado con un patrón biológico, que permitiría seleccionar los compuestos con las características estructurales específicas para unirse a un determinado receptor, aunque no se relacionen con la afinidad o naturaleza de su actividad.

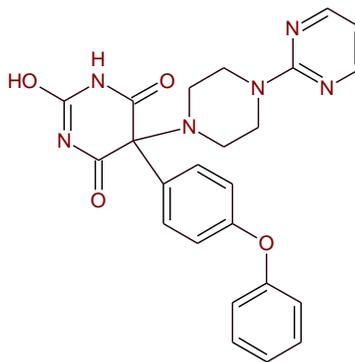
Teniendo en cuenta la gran variabilidad estructural de los fármacos que se unen a la MMP-9 y los análogos de indenopiridina **KC2** y benzoquinolinas **KC3** previamente sintetizados y determinada su actividad biológica citotóxica-antitumoral, se estudiaron las relaciones estructura-actividad de estos compuestos, con la finalidad de buscar patrones estructurales comunes que pudiesen ser correlacionados con su actividad biológica. Estos nuevos detalles estructurales facilitarían el diseño de nuevos inhibidores de MMP-9 más selectivos.

En el presente trabajo se realizó un estudio de modelado molecular basado en el farmacóforo. El conjunto de datos seleccionado para el modelado consta de las moléculas más activas de la serie, los derivados benzoquinolina **KC2-15**, **KC2-17** y **KC2-18**, y los siete compuestos inhibidores de MMP-9 con estructura cristalina reportada en Cambridge Crystallographic Database AM409 **36**, RO-206-0222 **37**, An-1 **38** MJ-24 **39**, MS-560 **40**, Batimastat **41** y Marimastat **42**, asociados con los correspondientes valores de actividades biológicas. Las estructuras químicas optimizadas de los diez compuestos seleccionados

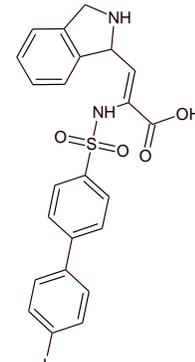
empleando el programa CACHE Worksystem versión 6.0 representan el conjunto de datos empleados para generar el modelo farmacofórico, utilizando el programa GALAHAD (Sybyl 8.1)



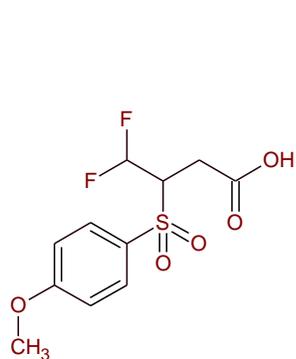
**36**



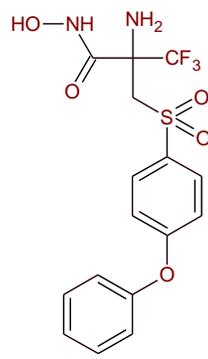
**37**



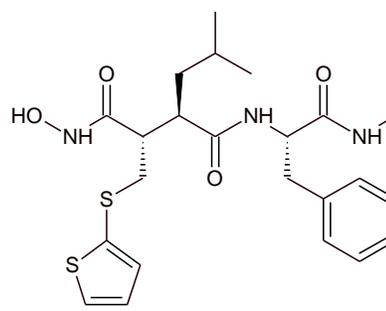
**38**



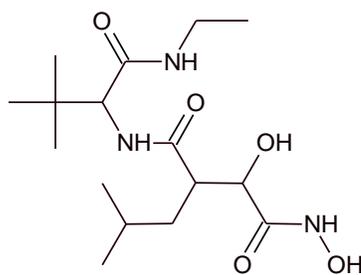
**39**



**40**



**41**



**42**

Con el editor del sistema CACHE 6.0 se construyeron las estructuras tridimensionales de los derivados KC a partir de los datos de la estructura

cristalina KC-58. Posteriormente estas moléculas fueron optimizadas mediante Mecánica Molecular (MM) empleando como campo de fuerza MM3.

La MM se realizó mediante la aplicación del método de Gradiente Conjugado, el cálculo se realizó hasta alcanzar la convergencia en 0,001 Kcal/mol.

Las estructuras optimizadas por MM fueron sometidas a una búsqueda del espacio conformacional utilizando Dinámica Molecular (DM) a alta temperatura (300 °K) con el campo de fuerza MM3. Los archivos de trayectoria obtenidos fueron analizados seleccionando las conformaciones de mínima energía obtenidas y se minimizaron utilizando el método de mecánica cuántica semiempírico MOPAC acompañado del método AM1; esta combinación provee una manera rápida de explorar el espacio conformacional e identificar conformaciones de baja energía de los compuestos a estudiar, aun cuando no esperábamos grandes cambios en cuanto a la conformación.

Las estructuras de menor energía obtenidas a partir de la búsqueda geométrica se emplearon como modelos de la base de datos para generar el farmacóforo.

Para determinar el farmacóforo se empleó la Aplicación de GALAHAD, contenida en el programa SYBYL®, y así estudiar la serie de compuestos activos seleccionados y proponer un farmacóforo que se corresponda con los resultados obtenidos experimentalmente.

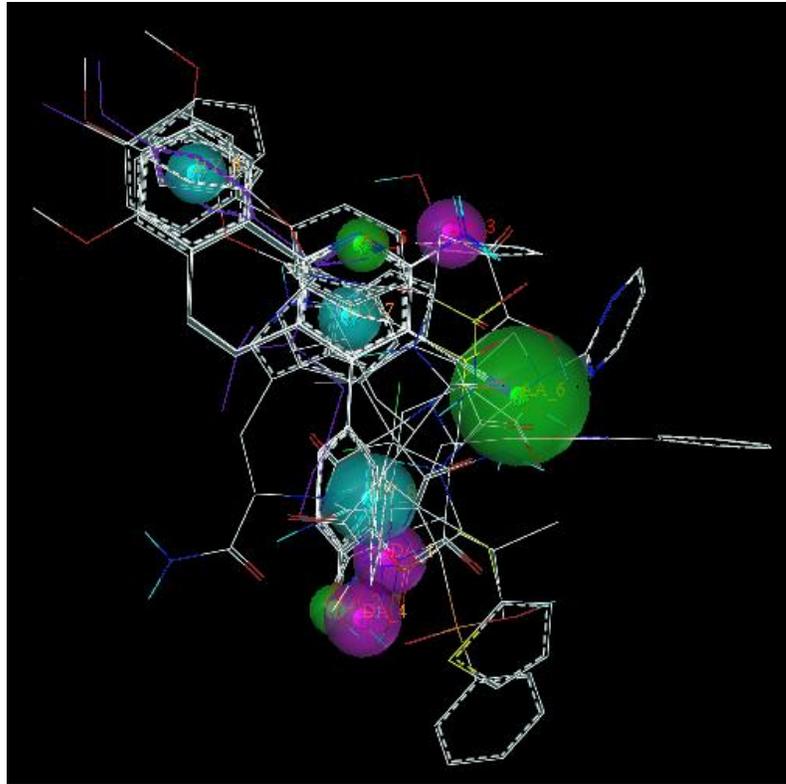
Se generaron veinte hipótesis del farmacóforo, las cuales cada una fue analizada según los siguientes criterios, nombrados en orden de importancia:

- Visual
- Número de hits
- Estéricos
- Enlaces de hidrógeno
- Especificidad
- Energía

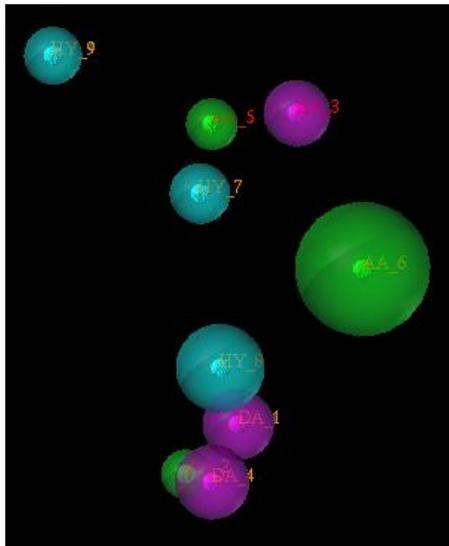
El modelo mostrado en la **figura 28** corresponde con la mejor puntuación de las características evaluadas. En el análisis visual se observó la mejor alineación siendo el único compuesto no alineado con el farmacoforo MJ-24, así como obtuvo un alto valor de hits, enlaces de hidrógeno y buenos valores de especificidad y energía.

En este modelo se pueden observar las características estructurales comunes esenciales para la unión específica a la proteína MMP-9. El modelo propuesto consiste en nueve características farmacofóricas básicas: tres aceptores de enlaces de hidrógeno, tres donadores de enlaces de hidrógeno y tres centros hidrofóbidos

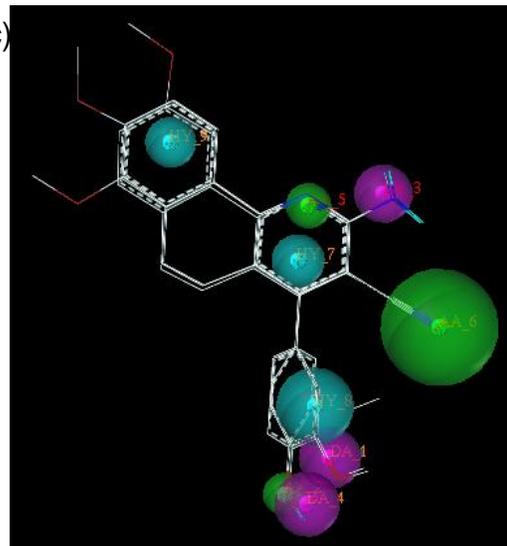
a)



b)



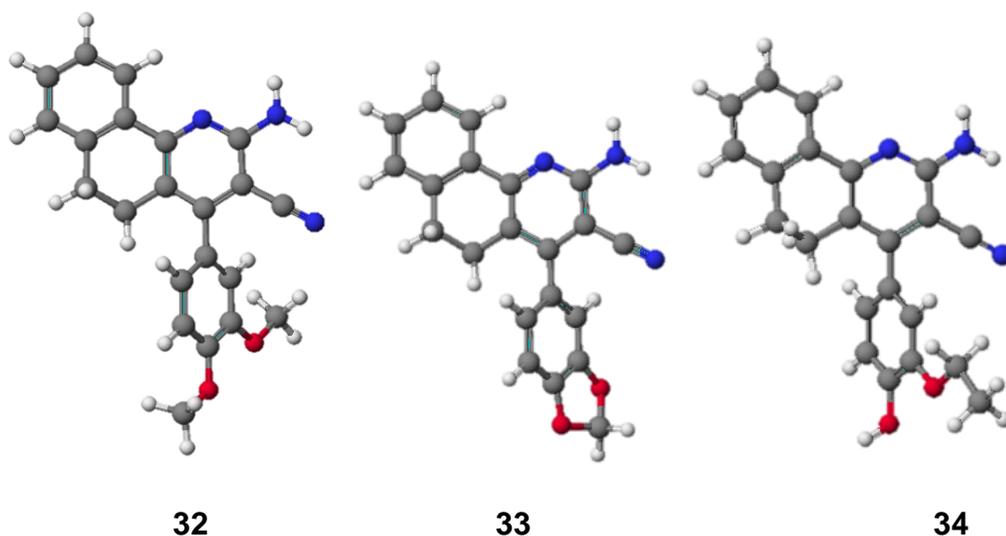
c)

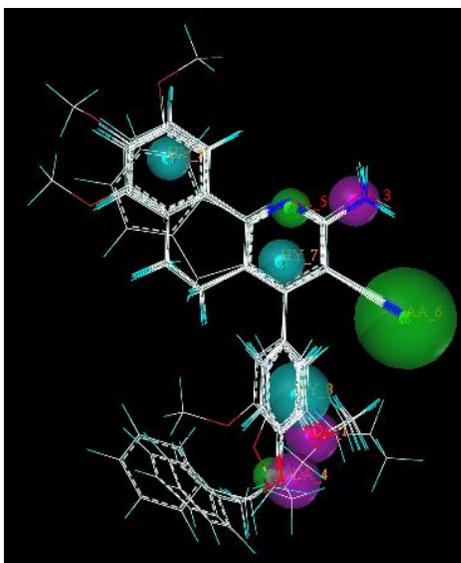


**Figura 28.** a), b) Modelo farmacofórico, c) Alineación con los derivados KC La esfera verde representa los átomos aceptores de protones, la esfera magenta los átomos donadores de protones y la azul claro los grupos hidrofobicos.

En general, los dos anillos fusionados al igual que el modelo farmacofórico generado por las combretastatinas y la colchicina parece ser esencial para la actividad, además de la importancia del grupo nitrilo como aceptor de protones y de los sustituyentes OH y OMe en el anillo fenil.

Para validar el modelo farmacofórico obtenido se realizó la alineación de este modelo con una nueva base de datos conformada por las moléculas derivados **KC2-5**, **KC3-6**, **KC3-7**, **KC3-8**, **KC2-16**, **KC3-19**, con valores de actividad biológica citotóxica antitumoral variable, y los tres compuestos ZINC19095780 **32**, ZINC19095811 **33** y ZINC19095832 **34** estructuralmente similares a los derivados KC extraídos de la base de datos libre para búsqueda virtual ZINC a partir de las características farmacofóricas comunes previamente determinadas (**figura 29**).



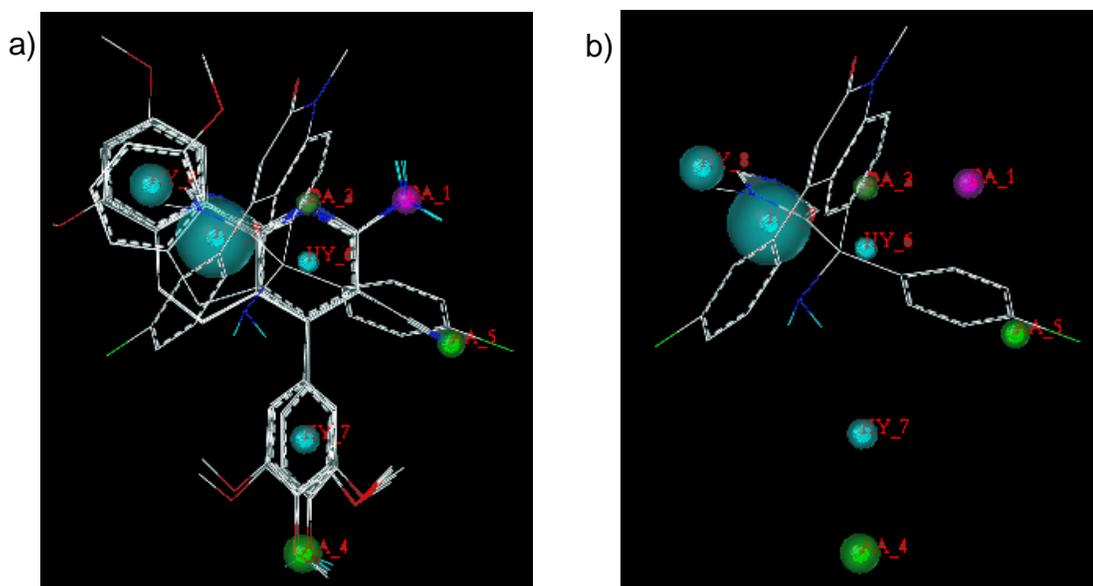


**Figura 29.** Validación del farmacóforo.

Debido a que las variaciones estructurales de los derivados KC sintetizados son pocas, se observa una muy buena alineación con el farmacóforo planteado. En cuanto, a la importancia de los sustituyentes OH y OMe en el anillo fenil comparado con los compuestos **KC3-6**, **KC3-7** y **KC3-8** que poseen el grupo OH protegido por un grupo bencil, se podría presumir que este no permite que el compuesto se acomode adecuadamente en el sitio activo de la proteína MMP-9 para ejercer su acción, además de ser esencial estos grupos para las interacciones electrostáticas con la proteína, como lo confirma el modelo farmacofórico generado.

Los resultados teóricos obtenidos se correlacionan con la actividad biológica citotóxica-antitumoral de los compuestos ensayados.

En vista, de los antecedentes anteriormente planteados, en relación, a la posible actividad dual de estos compuestos como citotóxicos-antitumorales y como antichagasicos, se planteó realizar un modelo farmacofórico para Chagas incluyendo en la base de datos además de los derivados **KC2-5**, **KC2-23**, **KC2-29**, **KC3-15**, **KC3-18** y **KC3-19**, el compuesto tipifarnib **4**, el cual esperábamos guardara alguna relación estructural con nuestros compuestos, en cuanto al anillo quinolina (**figura 30**).



**Figura 30.** a) Modelo farmacofórico para Chágas, b) Alineación del Tipifarnib con el modelo.

Los resultados obtenidos mostraron todo lo contrario, al observarse una alineación desfavorable de los derivados KC con respecto al tipifarnib, generando un farmacóforo para los derivados KC por la cantidad de coincidencias estructurales entre los mismos, sin coincidir con alguna característica estructurales específicas del tipifarnib. De ahí, se puede sugerir

que la actividad del tipifarnib sobre la síntesis de ergosterol, podría deberse en parte a la presencia de anillo sustituyente azol, por lo que, los derivados KC podrían tener un mecanismo de acción diferente al del tipifarnib, y esto nos lleva a proponer un posible mecanismo de acción de estos compuestos relacionados con la posible inhibición de la TOPII-ADN, tal como se mencionó anteriormente.

## 4. Parte Experimental

### 4.1. Consideraciones generales

Los puntos de fusión se determinaron en un aparato Fisher-Jhons y no fueron corregidos.

Los espectros de Infrarrojo se registraron en un espectrofotómetro Shimadzu modelo 470 y las absorbancias se reportaron en  $\text{cm}^{-1}$ .

Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear Protónica y de Carbono (RMN  $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ ), así como los bidimensionales (HETCOR Y FLOCK), se realizaron en un espectrofotómetro JEOL ECLIPSE 270 (270 MHz), de la Facultad de Farmacia-UCV.

Para todos los casos, se utilizó  $\text{CHCl}_3\text{-d}$  ó  $\text{DMSO-d}_6$  como solventes. El desplazamiento químico ( $\delta$ ) se reportó en ppm, empleando como patrón interno trazas de  $\text{CHCl}_3$  o DMSO.

Los análisis elementales fueron realizados en un equipo Perkin Elmer 2400CHN en la unidad de Servicios Centrales de Investigación de la Universidad de Málaga, Málaga, España, los resultados están en el rango de  $\pm 0,4 \%$  de los valores calculados.

Los análisis cristalográficos por rayos X fueron realizados en el centro de Química, IVIC, empleando un difractómetro Huber A-8901 (Huber Diffraktionstechnik GMBH, Rimsting, Germany), utilizando una radiación de grafito monocromática Mo-K $\alpha$  ( $\lambda$ : 0.71069 Å).

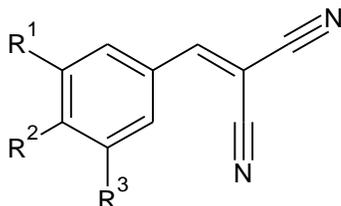
La cromatografía en capa fina (TLC) se realizó en placas POLYGRAM<sup>®</sup> de sílica gel con indicador fluorescente UV<sub>254</sub>.

La evaluación preliminar *in vivo* de la actividad citotóxica-antitumoral fue realizada en el Department of Urology, University Hospital Charité, Humboldt University” y en “Berlin Institute for Urology Research, Berlin, Germany”, según protocolo.

La evaluación preliminar *in vivo* de la actividad antichagásica fue realizada en la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, México, DF 11340, México, según protocolo.

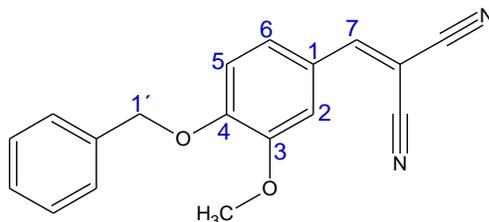
## 4.2. Sección Química

### Procedimiento general para la síntesis de derivados de bencilidenemalononitrilo KC1a-g



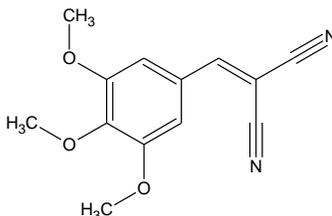
Una solución del benzaldehído respectivo (1 mmol; 0,2423g) y malononitrilo (1 mmol; 0,0661g), en etanol seco (2 mL) se dejó agitando a temperatura ambiente toda la noche. El sólido obtenido se filtró, lavó con etanol frío y posteriormente se secó en la estufa al vacío.

#### 4-benciloxi-3-metoxibencilidenemalononitrilo KC1a.



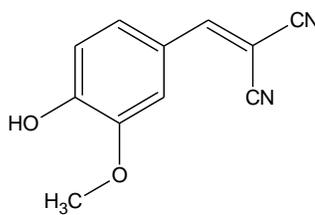
**Rendimiento:** 76%. **P.f.:** 160-162 °C. **IR (KBr, cm<sup>-1</sup>):** 3040, 2224 (C≡N), 2960, 1580, 1500, 1270. **RMN <sup>1</sup>H, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm:** 3.93 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 5.25 (s, 2H, CH<sub>2</sub>); 6.95 (d, 1H, H<sub>5</sub>, *J* = 8.64 Hz); 7.30 (dd, 1H, H<sub>6</sub>, *J*<sub>1</sub> = 2.21, *J*<sub>2</sub> = 8.64 Hz); 7.40-7.35 (m, 5H, Ar); 7.60 (s, 1H, H<sub>7</sub>); 7.67 (d, 1H, H<sub>2</sub>, *J* = 1.97 Hz).

### 3, 4, 5-trimetoxibencilidenemalononitrilo KC1b.



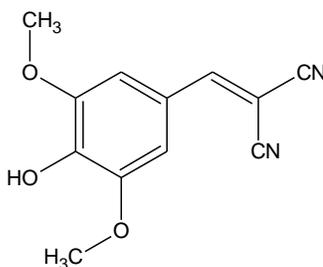
**Rendimiento:** 98%. **P.f.:** 136-138 °C (Lit. 140 °C).<sup>66</sup> **IR (KBr, cm<sup>-1</sup>):** 2944, 2224 (C≡N), 1568, 1497, 1465, 1452, 1340, 1321, 1254.

### 4-hidroxi-3-metoxibencilidenemalononitrilo KC1c.



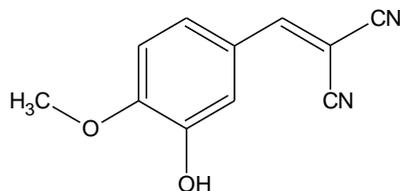
**Rendimiento:** 96%. **P.f.:** 124-126 °C. **IR (KBr, cm<sup>-1</sup>):** 3328, 2224 (C≡N), 1580, 1564, 1504, 1459, 1427, 1289. **RMN <sup>1</sup>H, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm:** 3.96 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 6.34 (sa, 1H, OH); 6.99 (d, 1H, H<sub>2</sub>, J = 8.20 Hz); 7.30 (dd, 1H, H<sub>6</sub>, J<sub>1</sub> = 2.20, J<sub>2</sub> = 8.20 Hz); 7.70 (d, 1H, H<sub>2</sub>; J = 2.20 Hz).

### 4-hidroxi-3, 5-metoxibencilidenemalononitrilo KC1d.



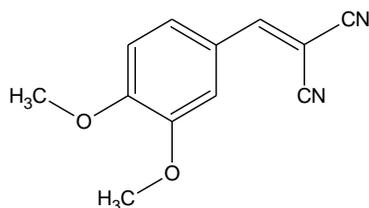
**Rendimiento:** 94%. **P.f.:** 150-152 °C. **IR (KBr, cm<sup>-1</sup>):** 3424 (OH), 2224 (C≡N), 1568, 1500, 1456, 1321, 1292. **RMN <sup>1</sup>H, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm:** 3.94 (s, 6H, OCH<sub>3</sub>); 6.23 (sa, 1H, OH); 7.22 (d, 2H, H<sub>2</sub> y H<sub>6</sub>, J = 6.67 Hz); 7.59 (s, 1H, H<sub>7</sub>).

**3-hidroxi-4-metoxibencilidenemalononitrilo KC1e.**



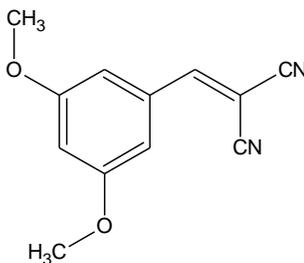
**Rendimiento:** 97%. **P.f.:** 164-166 °C. **IR (KBr, cm<sup>-1</sup>):** 3424 (OH), 2224(CN).

**3, 4-metoxibencilidenemalononitrilo KC1f.**



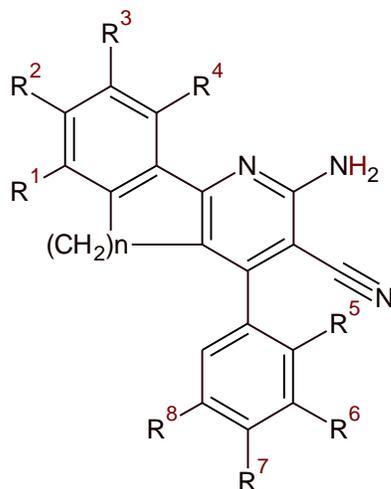
**Rendimiento:** 96%. **P.f.:** 134-136 °C (Lit. 142 °C).<sup>67</sup> **IR (KBr, cm<sup>-1</sup>):** 2224 (CN), 1606, 1580.

**2, 4-metoxibencilidenemalononitrilo KC1g.**



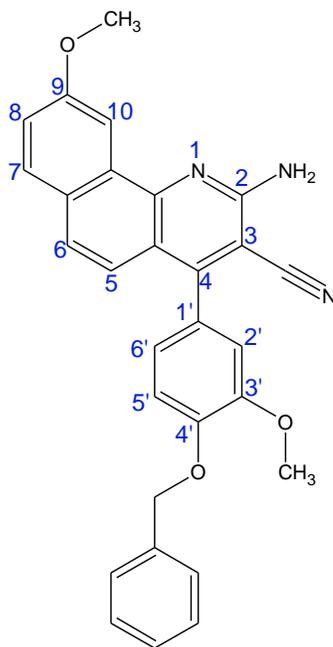
**Rendimiento:** 96%. **P.f.:** 142-144 °C (Lit. 144 °C).<sup>68</sup>

**Procedimiento general para la síntesis de 2-amino-4-aryl-5,6-dihidrobenzo[h]quinolina-3-carbonitrilo y 2-amino-4-aryl-5H-indeno[1,2-b]piridina-3-carbonitrilo.**



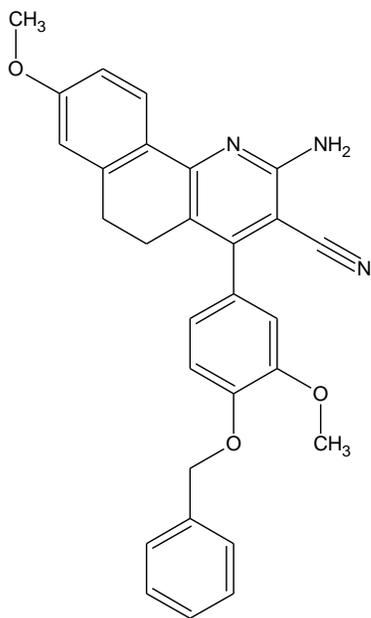
Una solución de la respectiva 1-indanona o 1-tetralona (1mmol), bencilidenemalononitrilo (1mmol; 0,0661g), acetato de amonio (2 mmol; 0,077g) y ácido acético (0,05 mL) en 1,5 mL de etanol absoluto, fue reflujaada toda la noche. La mezcla de reacción se dejó enfriar, el sólido formado se filtró y lavo con etanol frío y luego se recristalizó en etanol.

**2-amino-9-metoxi-4-(3'-metoxi-4'-benciloxi)fenil-5,6-dihidrobenzo[h]  
quinolina-3-carbonitrilo KC3-6.**



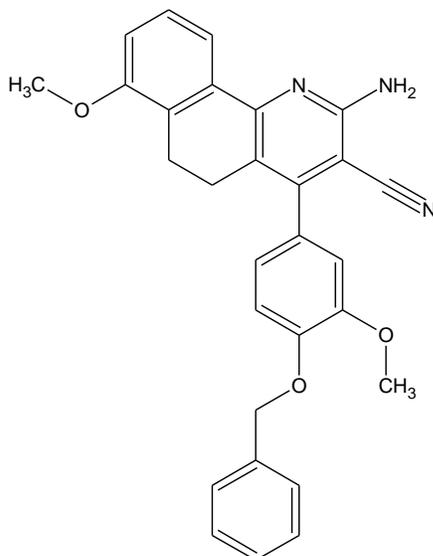
**Rendimiento:** 73%. **P.f.:** 218-220 °C. **IR (KBr, cm<sup>-1</sup>):** 3472-3360 (NH<sub>2</sub>), 2898, 2192, 2224 (C≡N), 1616, 1548, 1510, 1260, 1232. **RMN <sup>1</sup>H, DMSO<sub>d6</sub>, δ ppm:** 2.48 (m, 4H, H<sub>5a</sub>, H<sub>5b</sub>, y H<sub>6a</sub>, H<sub>6b</sub>); 3.78 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 3.80 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 5.14 (s, 2H, CH<sub>2</sub>); 6.70 (sa, 2H, NH<sub>2</sub>); 6.88-7.50 (m, 10H, Ar) 7.73 (d, 1H, H<sub>10</sub>, J = 2.72 Hz). **RMN <sup>13</sup>C, DMSO<sub>d6</sub>, δ ppm:** 24.89-27.11 (C<sub>5</sub> y C<sub>6</sub>); 55.79 (OCH<sub>3</sub>); 56.31 (OCH<sub>3</sub>); 70.40 (CH<sub>2</sub>); 89,79 (C<sub>3</sub>); 110,85 (C<sub>10</sub>); 113.16 (CH, Ar); 113.58 (CH, Ar); 116.71 (CH, Ar); 117.64 (CN); 119.15; 121.55 (CH, Ar); 128.51 (CH, Ar); 129.03 (CH, Ar); 129.10 (CH, Ar); 129.39 (CH, Ar); 131.81; 135.08; 137.51; 148.71; 149.28; 153.61; 154.31; 158.80; 159.36.

**2-amino-8-metoxi-4-(3'-metoxi-4'-benciloxi)fenil-5,6-dihidrobenzo[h]  
quinolina-3-carbonitrilo KC3-7.**



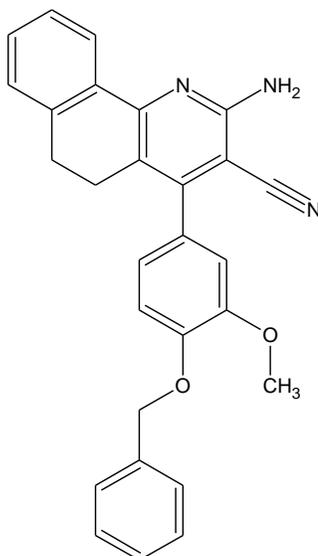
**Rendimiento:** 73%. **P.f.:** 222-224 °C. **IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ):** 3456-3328 (NH<sub>2</sub>), 2898, 2192, 2208 (CN), 1619, 1539, 1504, 1248, 1235. **RMN <sup>1</sup>H, DMSO<sub>d6</sub>,  $\delta$  ppm:** 2.49 (m, 4H, H<sub>5a</sub>, H<sub>5b</sub>, y H<sub>6a</sub>, H<sub>6b</sub>); 3.76 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 3.78 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 5.14 (s, 2H, CH<sub>2</sub>); 6.70 (sa, 2H, NH<sub>2</sub>); 6.83-7.44 (m, 10H, Ar) 8.15 (d, 1H, H<sub>10</sub>,  $J = 8.64$  Hz). **RMN <sup>13</sup>C, DMSO<sub>d6</sub>,  $\delta$  ppm:** 24.61-27.98 (C<sub>5</sub> y C<sub>6</sub>); 56.31 (OCH<sub>3</sub>); 70.48 (CH<sub>2</sub>); 89.66 (C<sub>3</sub>); 113.17 (CH, Ar); 113.59 (CH, Ar); 117.67 (CN); 119.01; 121.57 (CH, Ar); 126.17 (C<sub>10</sub>); 127.28 (CH, Ar); 128.35 (CH, Ar); 128.51 (CH, Ar); 129.03 (CH, Ar); 130.64 (CH, Ar); 134.07; 137.52; 139.64; 148.72; 149.28; 153.56; 154.48; 159.44.

**2-amino-7-metoxi-4-(3'-metoxi-4'-benciloxi)fenil-5,6-dihidrobenzo[h]  
quinolina-3-carbonitrilo KC3-8.**



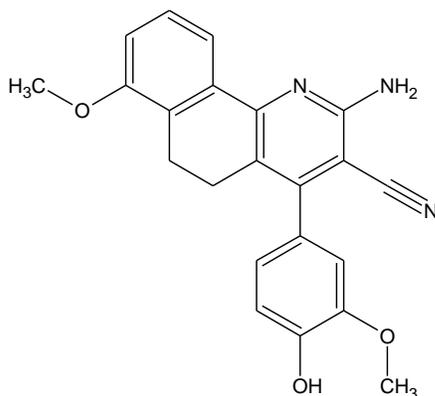
**Rendimiento:** 74%. **P.f.:** 182-184 °C. **IR (KBr, cm<sup>-1</sup>):** 3440-3328 (NH<sub>2</sub>), 2898, 2192, 2208 (CN), 1603, 1542, 1500, 1452, 1414, 1360, 1312, 1251. **RMN <sup>1</sup>H, DMSO<sub>d6</sub>, δ ppm:** 2.49 (m, 4H, H<sub>5a</sub>, H<sub>5b</sub>, y H<sub>6a</sub>, H<sub>6b</sub>); 3.78 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 3.80 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 5.14 (s, 2H, CH<sub>2</sub>); 6.67 (sa, 2H, NH<sub>2</sub>); 6.88-7.50 (m, 10H, Ar) 7.80 (d, 1H, H<sub>10</sub>, J = 7.91 Hz). **RMN <sup>13</sup>C, DMSO<sub>d6</sub>, δ ppm:** 20.37-24.01 (C<sub>5</sub> y C<sub>6</sub>); 56.09 (OCH<sub>3</sub>); 56.29 (OCH<sub>3</sub>); 70.47 (CH<sub>2</sub>); 89,68 (C<sub>3</sub>); 112.79 (CH, Ar); 113.20 (CH, Ar); 113.56 (CH, Ar); 117.67 (CN); 118.51 (C<sub>10</sub>); 118.77; 121.58 (CH, Ar); 127.53 (CH, Ar); 127.60 (CH, Ar); 128.54 (CH, Ar); 129.03 (CH, Ar); 135.05; 137.52; 148.72; 149.27; 153.45; 154.49; 156.29; 159.33.

**2-amino-4-(3'-metoxi-4'-benciloxi)fenil-5,6-dihidrobenzo[h] quinolina -3-carbonitrilo KC3-9.**



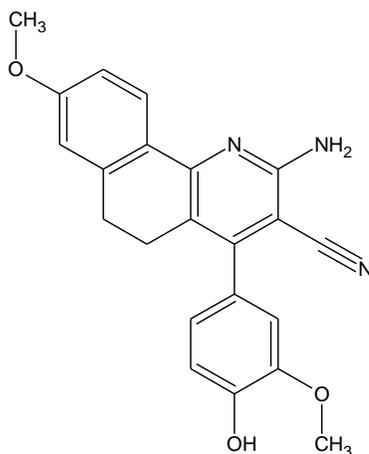
**Rendimiento:** 72%. **P.f.:** 224-226 °C. **IR (KBr, cm<sup>-1</sup>):** 3440-3344 (NH<sub>2</sub>), 2898, 2192, 2192 (CN), 1619, 1536, 1504, 1244. **RMN <sup>1</sup>H, DMSO<sub>d6</sub>, δ ppm:** 2.49 (m, 4H, H<sub>5a</sub>, H<sub>5b</sub>, y H<sub>6a</sub>, H<sub>6b</sub>); 3.78 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 3.80 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 5.14 (s, 2H, CH<sub>2</sub>); 6.63 (sa, 2H, NH<sub>2</sub>); 6.83-7.51 (m, 11H, Ar) 8.09 (d, 1H, H<sub>10</sub>, J = 8.66 Hz). **RMN <sup>13</sup>C, DMSO<sub>d6</sub>, δ ppm:** 24.63-28.35 (C<sub>5</sub> y C<sub>6</sub>); 55.82 (OCH<sub>3</sub>); 88.56 (C<sub>3</sub>); 70.48 (CH<sub>2</sub>); 112.86 (CH, Ar); 113.18 (CH, Ar); 113.28 (CH, Ar); 113.57 (CH, Ar); 113.82 (CH, Ar); 117.99 (CN); 121.54 (CH, Ar); 128.03 (C<sub>10</sub>); 128.52 (CH, Ar); 128.65 (CH, Ar); 128.80 (CH, Ar); 129.07 (CH, Ar); 129.11 (CH, Ar); 137.55; 141.74; 148.65; 149.27; 153.13; 154.67; 159.44; 161.44.

**2-amino-7-metoxi-4-(4'-hidroxi-3'-metoxi)fenil-5,6dihidrobenzo[h]quinolina-3-carbonitrilo KC3-15.**



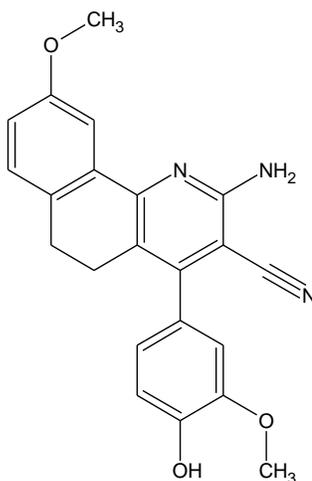
**Rendimiento:** 81%. **P.f.:** 182-184 °C. **IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ):** 3424-3376 (OH y  $\text{NH}_2$ ), 2976, 2898, 2224 ( $\text{C}\equiv\text{N}$ ), 1616, 1552, 1510, 1424, 1366, 1261. **RMN  $^1\text{H}$ ,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  ppm:** 2.59 (m, 4H,  $\text{H}_{5a}$ ,  $\text{H}_{5b}$ , y  $\text{H}_{6a}$ ,  $\text{H}_{6b}$ ); 3.84 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ); 3.91 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ); 5.29 (sa, 2H,  $\text{NH}_2$ ); 5.78 (sa, 1H, OH); 6.81-6.85 (m, 2H,  $\text{H}_{2'}$  y  $\text{H}_{6'}$ ); 6.93 (dd, 1H,  $\text{H}_8$ ,  $J = 7.40$ ); 7.01 (d, 1H,  $\text{H}_5$ ,  $J_1 = 8.40$ ); 7.29 (dd, 1H,  $\text{H}_9$ ,  $J_1 = 7.40$ ,  $J_2 = 7.90$ ); 7.90 (da, 1H,  $\text{H}_{10}$ ,  $J = 7.40$  Hz). **RMN  $^{13}\text{C}$ ,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  ppm:** 20.24-24.14 ( $\text{C}_5$  y  $\text{C}_6$ ); 55.71 ( $\text{OCH}_3$ ); 56.19 ( $\text{OCH}_3$ ); 90.74 ( $\text{C}_3$ ); 111.33; 112.29; 114.74; 117.25 (CN); 118.48; 120.57; 122.10; 127.36; 127.59; 127.91; 134.53; 146.48; 146.58; 156.15; 157.88.

**2-amino-8-metoxi-4-(3'-metoxi-4'-hidroxi)fenil-5,6dihidrobenzo[h]quinolina-3-carbonitrilo KC3-17.**



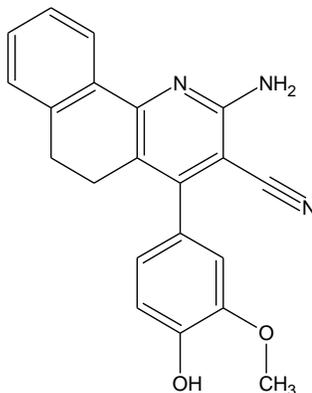
**Rendimiento:** 84%. **P.f:** 188-190 °C. **IR (KBr, cm<sup>-1</sup>):** 3360 (OH y NH<sub>2</sub>), 2976, 2898, 2192 (C≡N), 1603, 1542, 1436, 1356, 1248. **RMN <sup>1</sup>H, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm:** 2.66 (m, 4H, H<sub>5a</sub>, H<sub>5b</sub>, y H<sub>6a</sub>, H<sub>6b</sub>); 3.83 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 3.90 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 5.31 (sa, 2H, NH<sub>2</sub>); 5.84 (sa, 1H, OH); 6.70 (d, 1H, H<sub>2</sub>, J = 2.70 Hz); 6.79 (m, 2H, H<sub>7</sub> y H<sub>5</sub>); 6.85 (dd, 1H, H<sub>9</sub>, J<sub>1</sub> = 2.50 y J<sub>2</sub> = 8.70 Hz); 6.99 (dd, 1H, H<sub>6</sub>, J<sub>1</sub> = 2.50 y J<sub>2</sub> = 8.70 Hz); 8.20 (d, 1H, H<sub>10</sub>, J = 8.70 Hz). **RMN <sup>13</sup>C, DMSO-d<sub>6</sub>, δ ppm:** 28.38-24.63 (C<sub>5</sub> y C<sub>6</sub>); 56.34 (OCH<sub>3</sub>); 55.81 (OCH<sub>3</sub>); 88.67 (C<sub>3</sub>); 113.17; 113.24; 113.42; 115.94; 118.03 (CN); 121.91; 127.40; 128.00; 141.72; 147.58; 147.91; 153.47; 154.58; 159.44; 161.40. **Anal. Calcd.** para C<sub>22</sub>H<sub>19</sub>O<sub>3</sub>N<sub>3</sub>: C 70.76 %, H 5.13 %, N 11.25 %; encontrado: C 71.05 %, H 5.23 %, N 11.45 %.

**2-amino-9-metoxi-4-(3'-metoxi-4'-hidroxi)fenil-5,6dihidrobenzo[h]quinolina-3-carbonitrilo KC3-18.**



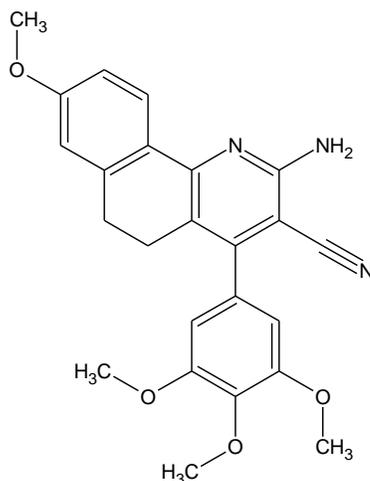
**Rendimiento:** 82%. **P.f.:** 224-226 °C. **IR (KBr, cm<sup>-1</sup>):** 3360 (OH y NH<sub>2</sub>), 2976, 2898, 2224 (C≡N), 1612, 1542, 1507, 1260. **RMN <sup>1</sup>H, CDCl<sub>3</sub>, δ ppm:** 2.65 (m, 4H, H<sub>5a</sub>, H<sub>5b</sub>, y H<sub>6a</sub>, H<sub>6b</sub>); 3.90 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 3.91 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 5.52 (sa, 2H, NH<sub>2</sub>); 5.80 (sa, 1H, OH); 6.81-6.84 (m, 2H, H<sub>2'</sub> y H<sub>6'</sub>); 6.90 (dd, 1H, H<sub>8</sub>, J<sub>1</sub> = 2.70, J<sub>2</sub> = 8.20 Hz); 7.01 (d, 1H, H<sub>5</sub>, J = 8.40 Hz); 7.09 (d, 1H, H<sub>7</sub>, J = 8.40 Hz); 7.84 (d, 1H, H<sub>10</sub>, J = 2.70 Hz). **RMN <sup>13</sup>C, DMSO<sub>d6</sub>, δ ppm:** 27.16-24.90 (C<sub>5</sub> y C<sub>6</sub>); 56.33 (OCH<sub>3</sub>); 55.78 (OCH<sub>3</sub>); 89.89 (C<sub>3</sub>); 110.84; 113.41; 115.95; 116.66 (CN); 117.73; 119.18; 121.93; 127.26; 129.36; 131.80; 135.13; 147.65; 147.93; 153.96; 154.24; 158.78; 159.37. **Anal. Calcd.** para C<sub>22</sub>H<sub>19</sub>O<sub>3</sub>N<sub>3</sub>: C 70.76 %, H 5.13 %, N 11.25 %; encontrado: C 70.84 %, H 5.07 %, N 11.39 %.

**2-amino-4-(3'-metoxi-4'-hidroxi)fenil-5,6-dihidrobenzo[h]quinolina-3-carbonitrilo KC3-19.**



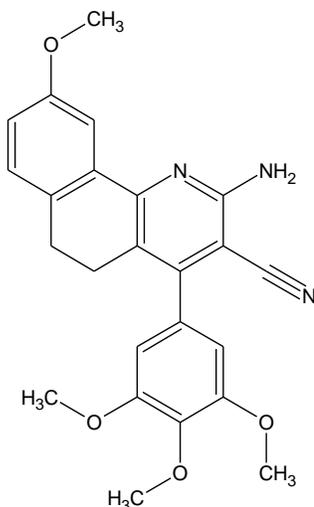
**Rendimiento:** 86%. **P.f.:** >300 °C. **IR (KBr, cm<sup>-1</sup>):** 3444 (OH y NH<sub>2</sub>), 2976, 2898, 2208 (C≡N), 1603, 1545, 1504, 1260. **RMN <sup>1</sup>H, CDCL<sub>3</sub>, δ ppm:** 2.66 (m, 4H, H<sub>5a</sub>, H<sub>5b</sub>, y H<sub>6a</sub>, H<sub>6b</sub>); 3.91 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 5.20 (sa, 2H, NH<sub>2</sub>); 5.79 (sa, 1H, OH); 6.82-6.83 (m, 2H, H<sub>2'</sub> y H<sub>6'</sub>); 7.00 (d, 1H, H<sub>5'</sub>); 7.17-7.36 (m, 3H, Ar). **RMN <sup>13</sup>C, DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ ppm:** 24.62-28.03 (C<sub>5</sub> y C<sub>6</sub>); 56.33 (OCH<sub>3</sub>); 89.74 (C<sub>3</sub>); 113.40; 115.95; 117.77 (CN); 119.03; 121.94; 126.15; 127.23; 128.33; 130.59; 134.12; 139.63; 147.65; 147.92; 153.90; 154.40; 159.45. **Anal. Calcd.** para C<sub>21</sub>H<sub>17</sub>O<sub>2</sub>N<sub>3</sub>: C 73.45 %, H 4.99 %, N 12.24 %; encontrado: C 73.62 %, H 5.05 %, N 12.42 %.

**2-amino-8-metoxi-4-(3',4', 5'-trimetoxi)fenil-5,6-dihidrobenzo[h]quinolina-3-carbonitrilo KC3-52.**



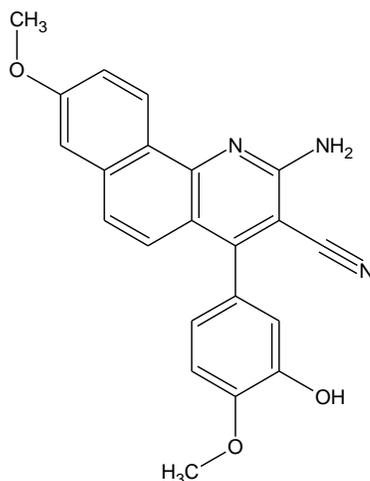
**Rendimiento:** 88%. **P.f.:** 238-240 °C. **IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ):** 3456-3344 ( $\text{NH}_2$ ), 2976, 2898, 2224 ( $\text{C}\equiv\text{N}$ ), 1606, 1494, 1238. **RMN  $^1\text{H}$ ,  $\text{DMSO}_{d6}$ ,  $\delta$  ppm:** 2.50 (m, 4H,  $\text{H}_{5a}$ ,  $\text{H}_{5b}$ , y  $\text{H}_{6a}$ ,  $\text{H}_{6b}$ ); 3.73 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ); 3.79 (s, 6H,  $\text{OCH}_3$ ); 3.80 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ); 6.66 (sa, 2H,  $\text{NH}_2$ ); 6.68 (s, 2H,  $\text{H}_{2'}$  y  $\text{H}_{6'}$ ); 6.84 (d, 1H,  $\text{H}_7$ ,  $J = 2.50$ ); 6.90 (dd, 1H,  $\text{H}_9$ ,  $J_1 = 2.50$ ,  $J_2 = 8.70$ ); 8.09 (d, 1H,  $\text{H}_{10}$ ,  $J = 8.70$ ). **RMN  $^{13}\text{C}$ ,  $\text{DMSO}_{d6}$ ,  $\delta$  ppm:** 24.62-28.30 ( $\text{C}_5$  y  $\text{C}_6$ ); 55.82 ( $\text{OCH}_3$ ); 56.65 (2C,  $\text{OCH}_3$ ); 60.63 ( $\text{OCH}_3$ ); 88.34 ( $\text{C}_3$ ); 106.60 ( $\text{C}_{2'}$  y  $\text{C}_{6'}$ ); 113.19-113.30 ( $\text{C}_7$  y  $\text{C}_9$ ); 117.78 (CN); 117.87; 126.86; 128.03 ( $\text{C}_{10}$ ); 132.09; 137.98; 141.78; 153.24; 153.38; 154.70; 159.40; 161.47. **Anal. Calcd.** para  $\text{C}_{24}\text{H}_{23}\text{O}_4\text{N}_3$ : C 69.05 %, H 5.55 %, N 10.07 %; encontrado: C 68.93 %, H 5.60 %, N 10.21 %.

**2-amino-9-metoxi-4-(3',4', 5'-trimetoxi)fenil-5,6-dihidrobenzo[h]quinolina-3-carbonitrilo KC3-53.**



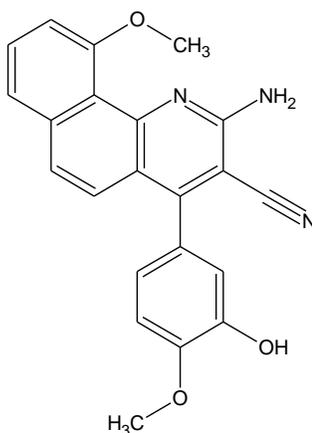
**Rendimiento:** 77%. **P.f.:** 278-280 °C. **IR (KBr, cm<sup>-1</sup>):** 3472-3328 (NH<sub>2</sub>), 2976, 2898, 2208 (C≡N), 1606, 1545, 1494, 1302, 1235. **RMN <sup>1</sup>H, DMSO<sub>d6</sub>, δ ppm:** 2.50 (m, 4H, H<sub>5a</sub>, H<sub>5b</sub>, y H<sub>6a</sub>, H<sub>6b</sub>); 3.73 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 3.79 (s, 6H, OCH<sub>3</sub>); 3.80 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 6.69 (s, 2H, H<sub>2'</sub> y H<sub>6'</sub>); 6.73 (sa, 2H, NH<sub>2</sub>); 6.94 (dd, 1H, H<sub>8</sub>, J<sub>1</sub> = 2.70, J<sub>2</sub> = 8.40); 7.17(d, 1H, H<sub>7</sub>, J = 8.40); 7.72 (d, 1H, H<sub>10</sub>, J = 2.70). **RMN <sup>13</sup>C, DMSO<sub>d6</sub>, δ ppm:** 24.88-27.09 (C<sub>5</sub> y C<sub>6</sub>); 55.80 (OCH<sub>3</sub>); 56.68 (2C, OCH<sub>3</sub>); 60.64 (OCH<sub>3</sub>); 89.60 (C<sub>3</sub>); 106.65 (C<sub>2'</sub> y C<sub>6'</sub>); 110.83 (C<sub>10</sub>); 116.76 (C<sub>8</sub>); 117.52 (CN); 119.05; 129.42 (C<sub>7</sub>); 153.41; 153.71; 154.36; 158.80; 159.30. **Anal. Calcd.** para C<sub>24</sub>H<sub>23</sub>O<sub>4</sub>N<sub>3</sub>: C 69.05 %, H 5.55 %, N 10.07 %; encontrado: C 69.11 %, H 5.58 %, N 10.33 %.

**2-amino-8-metoxi-4-(3'-hidroxi-4'-metoxi)fenil-5,6-dihidrobenzo[h]quinolina  
-3-carbonitrilo KC3-58.**



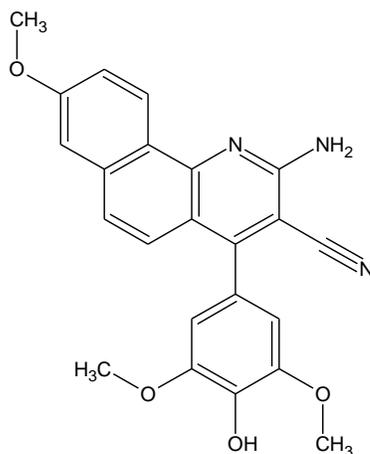
**Rendimiento:** 74%. **P.f.:** 201-203 °C. **IR (KBr, cm<sup>-1</sup>):** 3440-3344 (OH y NH<sub>2</sub>); 2912, 2832; 2192 (CN), 1609, 1542, 1500, 1433, 1366, 1312, 1244. **RMN <sup>1</sup>H, DMSO<sub>d6</sub>, δ ppm:** 2.49 (m, 4H, H<sub>5a</sub>, H<sub>5b</sub>, y H<sub>6a</sub>, H<sub>6b</sub>); 3.80 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 3.83 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 6.61 (sa, 2H, NH<sub>2</sub>); 6.72 (m, 2H, H<sub>2'</sub> y H<sub>6'</sub>); 6.83 (d, 1H, H<sub>7</sub>, *J* = 2.24 Hz); 6.90 (dd, 1H, H<sub>9</sub>, *J*<sub>1</sub> = 2.5, *J*<sub>2</sub> = 8.7 Hz); 7.02 (d, 1H, H<sub>5'</sub>, *J* = 8.9 Hz); 8.08 (d, 1H, H<sub>10</sub>, *J* = 8.7 Hz); 9.28 (s, 1H, OH). **RMN <sup>13</sup>C, DMSO<sub>d6</sub>, δ ppm:** 24.57 y 28.34 (C<sub>5</sub> y C<sub>6</sub>); 55.81 (OCH<sub>3</sub>); 56.13 (OCH<sub>3</sub>); 88.47 (C<sub>3</sub>); 112.55 (C<sub>5</sub>); 113.17 y 113.29 (C<sub>7</sub> y C<sub>9</sub>); 116.22 y 120.11 (C<sub>2'</sub> y C<sub>6'</sub>); 117.89 (CN); 126.90; 128.03 (C<sub>10</sub>); 129.10; 141.75; 146.82; 148.49; 153.28; 154.58; 159.40; 161.42. **Anal. Calcd.** para C<sub>22</sub>H<sub>19</sub>O<sub>3</sub>N<sub>3</sub>: C 70.76 %, H 5.13 %, N 11.25 %; encontrado: C 71.03 %, H 5.21 %, N 11.39 %.

**2-amino-9-metoxi-4-(3'-hidroxi-4'-metoxi) aril-5,6-dihidrobenzo[h]quinolina-3-carbonitrilo KC3-59.**



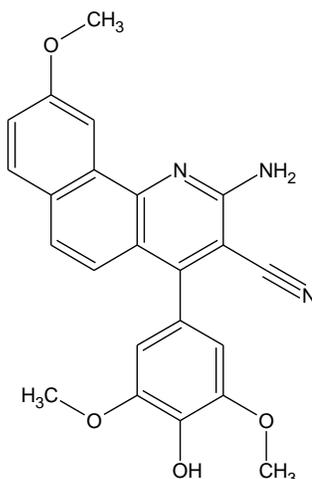
**Rendimiento:** 78%. **P.f.:** 268-270 °C. **IR (KBr, cm<sup>-1</sup>):** 3472-3494 (OH y NH<sub>2</sub>), 2976, 2898, 2208 (C≡N), 1606, 1539, 1427, 1257, 1228. **RMN <sup>1</sup>H, DMSO<sub>d6</sub>, δ ppm:** 2.49 (m, 4H, H<sub>5a</sub>, H<sub>5b</sub>, y H<sub>6a</sub>, H<sub>6b</sub>); 3.80 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 3.83 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 6,68 (sa, 2H, NH<sub>2</sub>); 6.72 (m, 2H, H<sub>2'</sub> y H<sub>6'</sub>); 6.93 (dd, 1H, H<sub>8</sub>, J<sub>1</sub> = 2.73, J<sub>2</sub> = 8.40 Hz); 7.02 (d, 1H, H<sub>5'</sub>, J = 9.15 Hz); 7.16 (d, 1H, H<sub>7</sub>, J = 8.40 Hz); 8.71 (d, 1H, H<sub>10</sub>, J = 2.73 Hz); 9.28 (sa, 1H, OH). **RMN <sup>13</sup>C, DMSO<sub>d6</sub>, δ ppm:** 24.84 y 27.12 (C<sub>5</sub> y C<sub>6</sub>); 55.79 (OCH<sub>3</sub>); 56.14 (OCH<sub>3</sub>); 89.72 (C<sub>3</sub>); 110.86 (C<sub>10</sub>); 112.59 (C<sub>5'</sub>); 116.22 y 120.11 (C<sub>2'</sub> y C<sub>6'</sub>); 116.71 (C<sub>8</sub>); 117.57 (CN); 119.06; 128.97; 129.41 (C<sub>7</sub>); 131.83; 135.05; 146.87; 148.58; 153.76; 154.24; 158.79; 159.32

**2-amino-8-metoxi-4-(3', 5'-dimetoxi-4'-hidroxi)fenil-5,6-dihidrobenzo[h]  
quinolina-3-carbonitrilo KC3-61.**



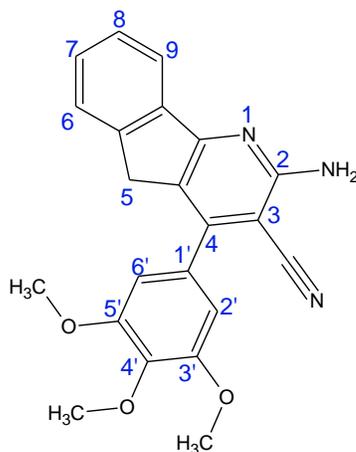
**Rendimiento:** 89%. **P.f.:** 276-278 °C. **IR (KBr, cm<sup>-1</sup>):** 3360 (OH y NH<sub>2</sub>), 2976, 2898, 2192 (C≡N), 1603, 1539, 1500, 1251.. **RMN <sup>1</sup>H, DMSO<sub>d6</sub>, δ ppm:** 2.49 (m, 4H, H<sub>5a</sub>, H<sub>5b</sub>, y H<sub>6a</sub>, H<sub>6b</sub>); 3.77 (s, 6H, OCH<sub>3</sub>); 3.80 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 6,58 (sa, 2H, NH<sub>2</sub>); 6.63 (s, 2H, H<sub>2'</sub> y H<sub>6'</sub>); 6.83 (d, 1H, H<sub>7</sub>, J = 2.20); 6.90 (dd, 1H, H<sub>5'</sub>, J<sub>1</sub> = 2.20, J<sub>2</sub> = 8.70 Hz); 8.08 (d, 1H, H<sub>10</sub>, J = 8.70 Hz); 8.69 (sa, 1H, OH). **RMN <sup>13</sup>C, DMSO<sub>d6</sub>, δ ppm:** 24.64 y 28.38 (C<sub>5</sub> y C<sub>6</sub>); 55.82 (OCH<sub>3</sub>); 56.75 (OCH<sub>3</sub>); 88.70 (C<sub>3</sub>); 106.87 (C<sub>2'</sub> y C<sub>6'</sub>); 113.20 (C<sub>7</sub> y C<sub>9</sub>); 117.94 (CN); 118.06; 126.42; 126.98; 128.00 (C<sub>10</sub>); 136.52; 141.73; 148.37; 153.64; 154.58; 159.42; 161.41. **Anal. Calcd.** para C<sub>23</sub>H<sub>21</sub>O<sub>4</sub>N<sub>3</sub>: C 68.47 %, H 5.25 %, N 10.42 %; encontrado: C 68.50 %, H 5.31 %, N 10.73 %.

**2-amino-9-metoxi-4-(3', 5'-dimetoxi-4'-hidroxi)fenil-5,6-dihidrobenzo[h]  
quinolina-3-carbonitrilo KC3-62.**



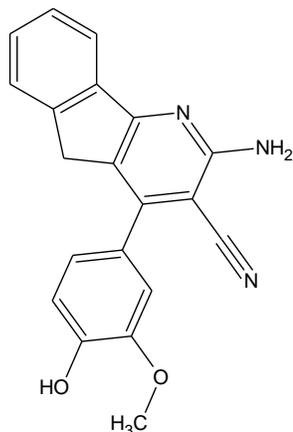
**Rendimiento:** 88%. **P.f.:** 208-210 °C. **IR (KBr, cm<sup>-1</sup>):** 3440-3360 (OH y NH<sub>2</sub>) 2224 (CN) 1596, 1545, 1504, 1241. **RMN <sup>1</sup>H, DMSO<sub>d6</sub>, δ ppm:** 2.49 (m, 4H, H<sub>5a</sub>, H<sub>5b</sub>, y H<sub>6a</sub>, H<sub>6b</sub>); 3.77 (s, 6H, OCH<sub>3</sub>); 3.80 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 6.64 (s, 2H, H<sub>2'</sub> y H<sub>6'</sub>); 6,67 (sa, 2H, NH<sub>2</sub>); 6.93 (dd, 1H, H<sub>8</sub>, J<sub>1</sub> = 2.73, J<sub>2</sub> = 8.40 Hz); 7.17 (d, 1H, H<sub>7</sub>, J = 8.40); 7.71 (d, 1H, H<sub>10</sub>, J = 2.73 Hz); 8.71 (sa, 1H, OH). **RMN <sup>13</sup>C, DMSO<sub>d6</sub>, δ ppm:** 24.92 y 27.17 (C<sub>5</sub> y C<sub>6</sub>); 55.79 (OCH<sub>3</sub>); 56.75 (OCH<sub>3</sub>); 89.93 (C<sub>3</sub>); 106.88 (C<sub>2'</sub> y C<sub>6'</sub>); 110.83 (C<sub>10</sub>); 116.67 (C<sub>8</sub>); 117.73 (CN); 119.22; 126.28; 129.38 (C<sub>7</sub>); 131.82; 135.13; 136.60; 148.39; 154.13; 154.24; 158.79; 159.34. **Anal. Calcd.** para C<sub>23</sub>H<sub>21</sub>O<sub>4</sub>N<sub>3</sub>: C 68.47 %, H 5.25 %, N 10.42 %; encontrado: C 68.73 %, H 5.50 %, N 10.71 %.

**2-amino-4-(3', 4', 5'-trimetoxi)fenil-5,6-dihidroindeno[1,2-b]piridina-3-carbonitrilo KC2-5.**



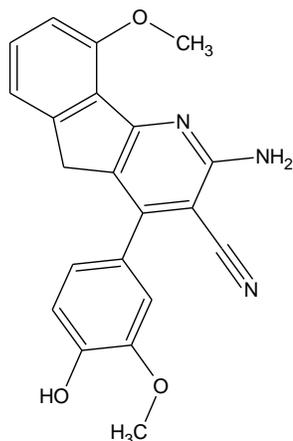
**Rendimiento:** 86%. **P.f.:** 288-290°C. **IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ):** 3440-3360 ( $\text{NH}_2$ ), 2944, 2208 (CN), 1638, 1561, 1504, 1459, 1408, 1366, 1321, 1280. **RMN  $^1\text{H}$ ,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  ppm:** 3.85 (s, 2H,  $\text{H}_{5a}$  y  $\text{H}_{5b}$ ); 3.90 (s, 6H,  $\text{OCH}_3$ ); 3.95 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ); 5.26 (sa, 2H,  $\text{NH}_2$ ); 6.71 (s, 2H,  $\text{H}_{2'}$  y  $\text{H}_{6'}$ ); 7.39-7.54 (m, 3H, Ar); 8.26 (da, 1H,  $\text{H}_9$ ,  $J = 7.40$ ). **RMN  $^{13}\text{C}$ ,  $\text{DMSO}_{d6}$ ,  $\delta$  ppm:** 39,46( $\text{C}_5$ ); 57.01 ( $\text{OCH}_3$ ); 61.15 ( $\text{OCH}_3$ ); 106.73; 106.92; 121.02; 126.21; 127.89; 129.11; 134.26; 137.91; 141.37; 143.89; 145.15; 147.35; 153.73; 153.98; 159.98.

**2-amino-4-(3'-metoxi-4'-hidroxi)fenil-5,6-dihidroindeno[1,2-b]piridina-3-carbonitrilo KC2-16.**



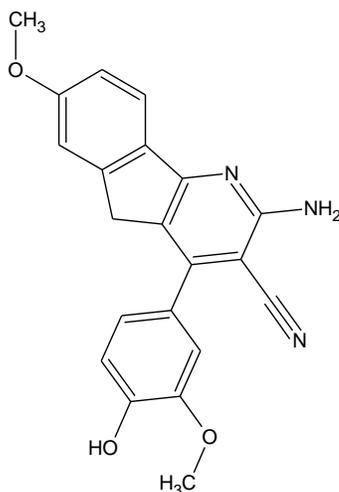
**Rendimiento:** 91%. **P.f.:** 228-230 °C. **IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ):** 3472-3376 ( $\text{NH}_2$ ), 2208 (CN), 1554, 1510. **RMN  $^1\text{H}$ ,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  ppm:** 3.82 (s, 2H,  $\text{H}_{5a}$  y  $\text{H}_{5b}$ ); 3.95 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ); 5.26 (sa, 2H,  $\text{NH}_2$ ); 5.89 (sa, 1H, OH); 7.02-7.50 (m, 6H, Ar); 8.31 (da, 1H,  $\text{H}_9$ ,  $J = 5.90$ ). **RMN  $^{13}\text{C}$ ,  $\text{DMSO}_{d6}$ ,  $\delta$  ppm:** 39.46 ( $\text{C}_5$ ); 56.50 ( $\text{OCH}_3$ ); 113.30; 116.21; 120.82; 121.98; 125.97; 127.60; 127.94; 128.77; 133.95; 141.34; 143.78; 144.86; 147.44; 148.29. **Anal. Calcd.** para  $\text{C}_{20}\text{H}_{15}\text{O}_2\text{N}_3$ : C 72.94 %, H 4.59 %, N 12.76 %; encontrado: C 73.05 %, H 4.63 %, N 12.91 %.

**2-amino-9-metoxi-4-(3'-metoxi-4'-hidroxi)fenil-5,6-dihidroindeno[1,2-b]piridina-3-carbonitrilo KC2-23.**



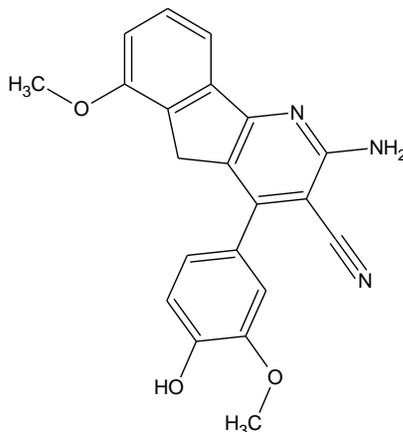
**Rendimiento:** 91%. **P.f.:** 304-306 °C. **IR (KBr, cm<sup>-1</sup>):** 3456-3312 (NH<sub>2</sub> y OH), 2224 (CN), 1593, 1555, 1500, 1369. **RMN <sup>1</sup>H, DMSO<sub>d6</sub>, δ ppm:** 3.73 (s, 2H, H<sub>5a</sub> y H<sub>5b</sub>); 3.83 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 3.91 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 6.60 (sa, 2H, NH<sub>2</sub>); 6.91 (d, 1H, H<sub>5</sub>, *J* = 8.15); 7.01-7.05 (m, 2H, Ar); 7.14-7.18 (m, 2H, Ar); 7.38 (dd, 1H, H<sub>7</sub>, *J*<sub>1</sub> = 7.90, *J*<sub>2</sub> = 8.15); 9.42 (s, 1H, OH). **RMN <sup>13</sup>C, DMSO<sub>d6</sub>, δ ppm:** 34.03 (C<sub>5</sub>); 56.16 (OCH<sub>3</sub>); 56.40 (OCH<sub>3</sub>); 85.76 (C<sub>3</sub>); 110.60 (CH, Ar); 113.43 (CH, Ar); 116.08 (C<sub>5</sub>); 118.11 (CH, Ar); 118.59 (CN); 122.17 (CH, Ar); 123.63 (C<sub>4a</sub>); 127.12 (C<sub>5a</sub>); 127.68 (C<sub>1'</sub>); 131.62 (C<sub>7</sub>); 148.03 (C<sub>3'</sub>); 148.08 (C<sub>4'</sub>); 148.89 (C<sub>9a</sub>); 149.60 (C<sub>4</sub>); 157.02 (C<sub>9</sub>); 162.02 (C<sub>2</sub>); 162.83 (C<sub>9b</sub>). **Anal. Calcd.** para C<sub>21</sub>H<sub>17</sub>O<sub>3</sub>N<sub>3</sub>: C 70.18 %, H 4.77 %, N 11.69 %; encontrado: C 70.27 %, H 4.71 %, N 11.83 %.

**2-amino-7-metoxi-4-(3'-metoxi-4'-hidroxi)fenil-5,6-dihidroindeno[1,2-b]piridina-3-carbonitrilo KC2-25.**



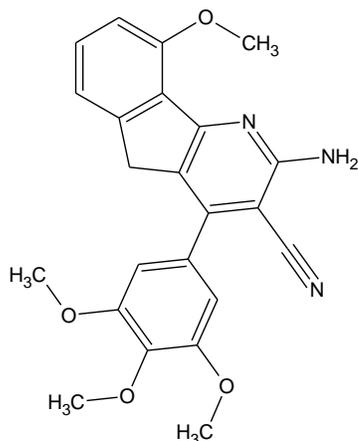
**Rendimiento:** 92%. **P.f.:** 286-288 °C. **IR (KBr, cm<sup>-1</sup>):** 3376 (NH<sub>2</sub> y OH), 2208 (CN), 1600, 1561, 1500, 1366. **RMN <sup>1</sup>H, DMSO<sub>d6</sub>, δ ppm:** 3.73 (s, 2H, H<sub>5a</sub> y H<sub>5b</sub>); 3.82 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 3.83 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 6.74 (sa, 2H, NH<sub>2</sub>); 6.90 (d, 1H, H<sub>5</sub>, *J* = 8.15); 7.01-7.06 (m, 2H, Ar); 7.17-7.19 (m, 2H, Ar); 7.75 (d, 1H, H<sub>9</sub>, *J* = 8.40); 9.45 (s, 1H, OH). **RMN <sup>13</sup>C, DMSO<sub>d6</sub>, δ ppm:** 33.97 (C<sub>5</sub>); 56.02 (OCH<sub>3</sub>); 56.38 (OCH<sub>3</sub>); 85.56 (C<sub>3</sub>); 110.97 (CH, Ar); 113.39 (CH, Ar); 114.65 (CH, Ar); 116.05 (C<sub>5</sub>); 118.67 (CN); 122.16 (CH, Ar); 122.85 (C<sub>9</sub>); 123.33; 127.06; 133.00; 148.00; 148.12; 148.89 (C<sub>9a</sub>); 148.95; 150.11; 161.66; 162.35 (C<sub>2</sub>); 162.59 (C<sub>9b</sub>).

**2-amino-6-metoxi-4-(3'-metoxi-4'-hidroxi)fenil-5,6-dihidroindeno[1,2-b]piridina-3-carbonitrilo KC2-26.**



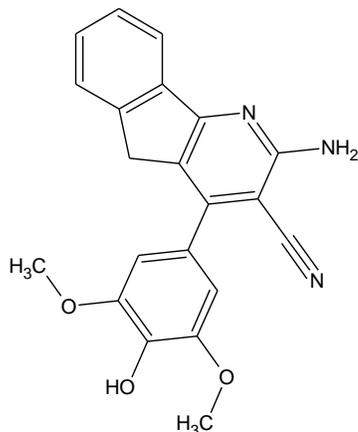
**Rendimiento:** 88%. **P.f.:** 272-274 °C. **IR (KBr, cm<sup>-1</sup>):** 3488 (NH<sub>2</sub> y OH), 2208, (CN), 1558, 1507, 1260. **RMN <sup>1</sup>H, DMSO<sub>d6</sub>, δ ppm:** 3.73 (s, 2H, H<sub>5a</sub> y H<sub>5b</sub>); 3.87 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 6.83 (sa, 2H, NH<sub>2</sub>); 6.96-7.05 (m, 2H, Ar); 7.18 (dd, 1H, Ar,  $J_1 = 1.73$ ,  $J_2 = 8.00$ ); 7.34 (d, 1H, H<sub>2</sub>,  $J = 1.73$ ); 7.43 (dd, 1H, H<sub>8</sub>,  $J_1 = 7.40$ ,  $J_2 = 7.80$ ); 7.66 (d, 1H, H<sub>9</sub>,  $J = 7.40$ ); 9.33 (s, 1H, OH). **RMN <sup>13</sup>C, DMSO<sub>d6</sub>, δ ppm:** 31.80 (C<sub>5</sub>); 55.81 (OCH<sub>3</sub>); 56.57 (OCH<sub>3</sub>); 85.76 (C<sub>3</sub>); 110.95; 110.99; 111.09 (CH, Ar); 113.40 (C<sub>9</sub>); 113.46 (CH, Ar); 116.18 (CH, Ar); 116.96; 118.59 (CN); 122.07 (CH, Ar); 129.45 (C<sub>3</sub>); 131.74; 133.79; 142.83 (C<sub>3'</sub>); 148.26 (C<sub>4'</sub>); 156.46.

**2-amino-9-metoxi-4-(3'-4'-5'-trimetoxi)fenil-5,6-dihidroindeno[1,2-b]piridina-3-carbonitrilo KC2-29.**



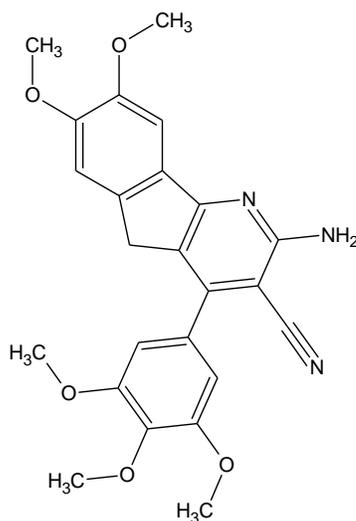
**Rendimiento:** 85%. **P.f.:** 258-260 °C. **IR (KBr, cm<sup>-1</sup>):** 3392-3312 (NH<sub>2</sub>), 2208, (CN), 1552, 1494, 1449, 1372, 1257. **RMN <sup>1</sup>H, DMSO<sub>d6</sub>, δ ppm:** 3.74 (s, 2H, H<sub>5a</sub> y H<sub>5b</sub>); 3.76 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 3.83 (s, 6H, OCH<sub>3</sub>); 3.91 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 6.69 (sa, 2H, NH<sub>2</sub>); 6.90 (s, 2H, H<sub>2'</sub> y H<sub>6'</sub>); 7.02 (d, 1H, *J* = 8.15); 7.14 (d, 1H, *J* = 7.60); 7.39 (dd, 1H, H<sub>7</sub>, *J*<sub>1</sub> = 7.60, *J*<sub>2</sub> = 8.15). **RMN <sup>13</sup>C, DMSO<sub>d6</sub>, δ ppm:** 33.92 (C<sub>5</sub>); 56.12 (OCH<sub>3</sub>); 56.70 (OCH<sub>3</sub>); 60.63 (OCH<sub>3</sub>); 85.63 (C<sub>3</sub>); 106.71 (C<sub>2'</sub> y C<sub>6'</sub>); 110.54 (CH, Ar); 118.14 (CH, Ar); 118.37 (CN); 123.62; 127.55; 131.73 (C<sub>7</sub>); 138.39; 148.97; 149.36; 154.47; 157.02 (C<sub>10</sub>); 161.90 (C<sub>2</sub>); 163.01 (C<sub>9b</sub>).

**2-amino-4-(3'-5'-dimetoxi-4'-hidroxi)fenil-5,6-dihidroindeno[1,2-b]piridina-3-carbonitrilo KC2-35.**



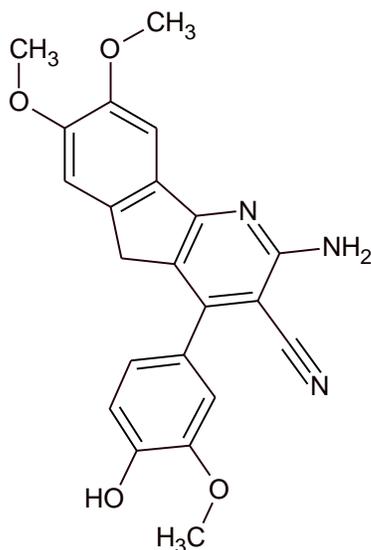
**Rendimiento:** 86%. **P.f.:** >300 °C. **IR (KBr, cm<sup>-1</sup>):** 3488 (NH<sub>2</sub> y OH), 2208, (CN), 1603, 1552, 1504, 1449. **RMN <sup>1</sup>H, DMSO<sub>d6</sub>, δ ppm:** 3.86 (s, 2H, H<sub>5a</sub> y H<sub>5b</sub>); 3.96 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 6.69 (sa, 2H, NH<sub>2</sub>); 7.02 (s, 2H, H<sub>2'</sub> y H<sub>6'</sub>); 7.40-7.52 (m, 2H, Ar), 7.59 (da, 1H, *J* = 7.18); 8.09 (da, 1H, H<sub>9</sub>, *J* = 7.18); 8.65 (sa, 1H, OH). **RMN <sup>13</sup>C, DMSO<sub>d6</sub>, δ ppm:** 34.54 (C<sub>5</sub>); 56.61 (OCH<sub>3</sub>); 56.94 (OCH<sub>3</sub>); 85.63 (C<sub>3</sub>); 106.84 (C<sub>2'</sub> y C<sub>6'</sub>); 118.37 (CN); 120.84 (C<sub>9</sub>); 125.99 (CH, Ar); 127.60 (CH, Ar); 128.77 (CH, Ar); 133.97; 141.44; 144.99; 148.79.

**2-amino-7, 8-dimetoxi-4-(3', 4', 5'-trimetoxi)fenil-5,6-dihidroindeno[1,2-b]piridina-3-carbonitrilo KC2-38.**



**Rendimiento:** 84%. **P.f.:** 278-280 °C. **IR (KBr, cm<sup>-1</sup>):** 3200 (NH<sub>2</sub>), 2208, (CN), 1632, 1552, 1497. **RMN <sup>1</sup>H, DMSO<sub>d6</sub>, δ ppm:** 3.69 (s, 2H, H<sub>5a</sub> y H<sub>5b</sub>); 3.74 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 3.82 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 3.83 (s, 6H, OCH<sub>3</sub>); 3.84 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 6.80 (sa, 2H, NH<sub>2</sub>); 6.93 (s, 2H, H<sub>2'</sub> y H<sub>6'</sub>); 7.22 (sa, 1H, H<sub>6</sub>); 7.32 (sa, 1H, H<sub>9</sub>). **RMN <sup>13</sup>C, DMSO<sub>d6</sub>, δ ppm:** 34.54 (C<sub>5</sub>); 56.03 (OCH<sub>3</sub>); 56.30 (OCH<sub>3</sub>); 56.68 (OCH<sub>3</sub>); 60.65 (OCH<sub>3</sub>); 85.09 (C<sub>3</sub>); 103.76 (C<sub>9</sub>); 106.75 (C<sub>2'</sub> y C<sub>6'</sub>); 108.92 (C<sub>6</sub>); 118.57 (CN); 123.86 131.69; 132.65; 138.42; 140.33; 149.44; 151.76; 153.43; 162.28 (C<sub>1</sub>); 163.32 (C<sub>9b</sub>).

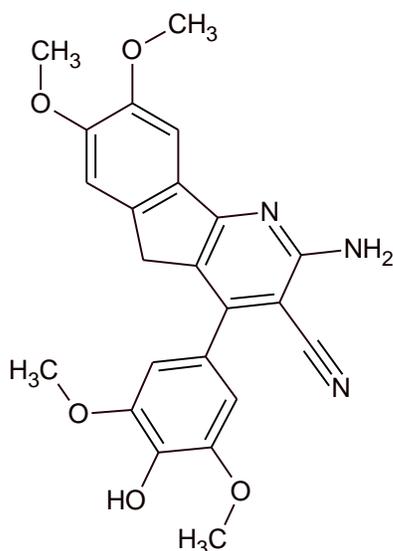
**2-amino-7, 8-dimetoxi-4-(3'-trimetoxi-4'-hidroxi)fenil-5,6-dihidroindeno[1,2-b]piridina-3-carbonitrilo KC2-39.**



**Rendimiento:** 90%. **P.f.:** 300-302 °C. **IR (KBr, cm<sup>-1</sup>):** 3424-3344 (NH<sub>2</sub> y OH), 2208, (CN), 1555, 1504, 1456, 1340, 1264. **RMN <sup>1</sup>H, DMSO<sub>d6</sub>, δ ppm:** 3.65 (s, 2H, H<sub>5a</sub> y H<sub>5b</sub>); 3.81 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 3.82 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 3.83 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 6.71 (sa, 2H, NH<sub>2</sub>); 6.89 (d, 1H, H<sub>5</sub>, *J* = 8.20); 7.03 (dd, 1H, H<sub>6</sub>, *J*<sub>1</sub> = 1.90, *J*<sub>2</sub> = 8.20); 7.18 (d, 1H, H<sub>2</sub>, *J* = 1.90); 7.21 (s, 1H, H<sub>6</sub>); 7.31 (s, 1H, H<sub>9</sub>); 9.44 (sa, 1H, OH). **RMN <sup>13</sup>C, DMSO<sub>d6</sub>, δ ppm:** 34.54 (C<sub>5</sub>); 56.05 (OCH<sub>3</sub>); 56.30 (OCH<sub>3</sub>); 56.36 (OCH<sub>3</sub>); 85.20 (C<sub>3</sub>); 103.79 (C<sub>9</sub>); 109.00-113.39 (C<sub>6</sub> y C<sub>2</sub>); 116.04 (C<sub>5</sub>); 118.78 (CN); 122.18 (C<sub>6</sub>); 123.83; 127.11; 132.36; 140.21; 147.99; 148.09; 149.43; 151.66; 162.38 (C<sub>1</sub>); 163.13 (C<sub>9b</sub>). **Anal. Calcd.** para C<sub>22</sub>H<sub>19</sub>O<sub>4</sub>N<sub>3</sub>: C 67.86 %, H 4.92 %, N 10.79 %; encontrado: C 67.80 %, H 5.03 %, N 10.97 %.

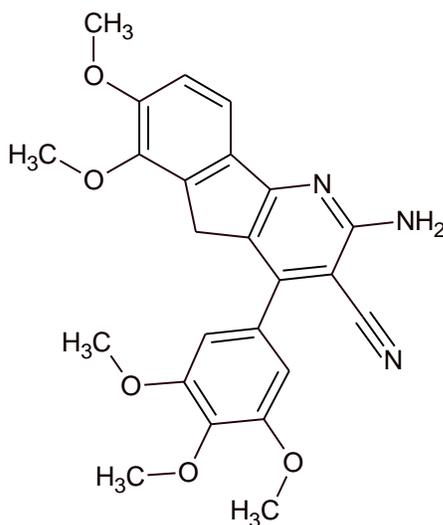
**2-amino-7, 8-dimetoxi-4-(3', 5'-dimetoxi-4'-hidroxi)fenil-5,6-dihidro**

**indeno[1,2-b]piridina-3-carbonitrilo KC2-40.**



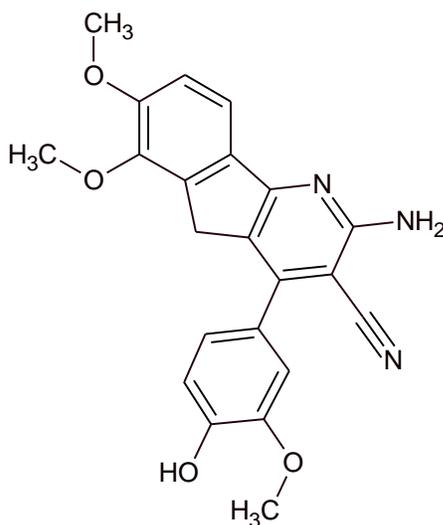
**Rendimiento:** 89%. **P.f.:** >300 °C. **IR (KBr, cm<sup>-1</sup>):** 3392 (NH<sub>2</sub> y OH), 2208, (CN), 1616, 1518, 1504, 1452. **RMN <sup>1</sup>H, DMSO<sub>d6</sub>, δ ppm:** 3.70 (s, 2H, H<sub>5a</sub> y H<sub>5b</sub>); 3.81 (s, 6H, OCH<sub>3</sub>); 3.82 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 3.83 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 6.72 (sa, 2H, NH<sub>2</sub>); 6.88 (s, 2H, H<sub>6'</sub> y H<sub>2'</sub>); 7.22 (s, 1H, H<sub>6</sub>); 7.31 (s, 1H, H<sub>9</sub>); 9.44 (sa, 1H, OH). **RMN <sup>13</sup>C, DMSO<sub>d6</sub>, δ ppm:** 34.54 (C<sub>5</sub>); 56.05 (OCH<sub>3</sub>); 56.31 (OCH<sub>3</sub>); 56.77 (OCH<sub>3</sub>); 85.26 (C<sub>3</sub>); 103.80 (C<sub>9</sub>); 107.00 (C<sub>2'</sub> y C<sub>6'</sub>); 109.02 (C<sub>6</sub>); 118.78 (CN); 123.87; 126.06; 132.36; 137.07; 140.26; 148.42; 149.42; 149.86; 151.69; 162.34 (C<sub>1</sub>); 163.15 (C<sub>9b</sub>).

**2-amino-6, 7-dimetoxi-4-(3', 4', 5'-trimetoxi)fenil-5,6-dihidroindeno[1,2-b]piridina-3-carbonitrilo KC2-41.**



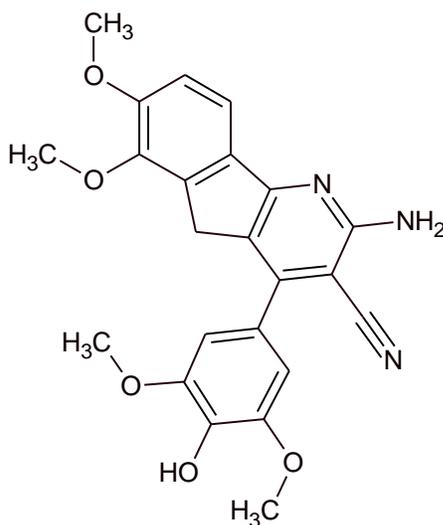
**Rendimiento:** 78%. **P.f.:** 278-260 °C. **IR (KBr, cm<sup>-1</sup>):** 3424 (NH<sub>2</sub>), 2208, (CN), 1555, 1488, 1360. **RMN <sup>1</sup>H, DMSO<sub>d6</sub>, δ ppm:** 3.74 (s, 2H, H<sub>5a</sub> y H<sub>5b</sub>); 3.76 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 3.79 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 3.83 (s, 6H, OCH<sub>3</sub>); 3.87 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 6.91 (sa, 2H, NH<sub>2</sub>); 6.99 (s, 2H, H<sub>2'</sub> y H<sub>6'</sub>); 7.16 (d, 1H, H<sub>8</sub>, J = 8.15); 7.74 (d, 1H, H<sub>9</sub>, J = 8.15). **RMN <sup>13</sup>C, DMSO<sub>d6</sub>, δ ppm:** 31.75 (C<sub>5</sub>); 56.65 (OCH<sub>3</sub>); 56.84 (OCH<sub>3</sub>); 60.27 (OCH<sub>3</sub>); 60.63 (OCH<sub>3</sub>); 85.09 (C<sub>3</sub>); 106.48 (C<sub>2'</sub> y C<sub>6'</sub>); 113.23 (C<sub>8</sub>); 116.47 (C<sub>9</sub>); 118.57 (CN); 132.46; 135.28; 136.96; 143.66; 145.77; 153.04; 153.75; 159.46.

**2-amino-6, 7-dimetoxi-4-(3'-metoxi-4'-hidroxi)fenil-5,6-dihidroindeno[1,2-b]piridina-3-carbonitrilo KC2-42.**



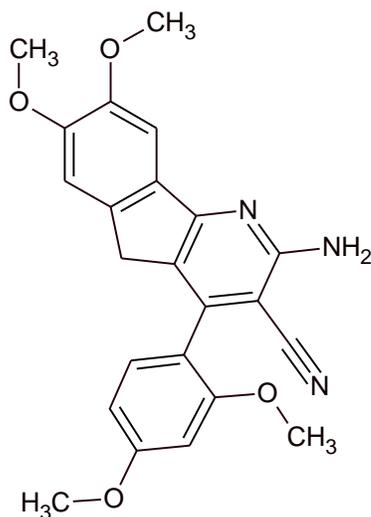
**Rendimiento:** 79%. **P.f.:** 276-278 °C. **IR (KBr, cm<sup>-1</sup>):** 3456-3344 (NH<sub>2</sub>) 2208 (CN), 1603, 1555, 1504. **RMN <sup>1</sup>H, DMSO<sub>d6</sub>, δ ppm:** 3.35 (s, 2H, H<sub>5a</sub> y H<sub>5b</sub>); 3.79 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 3.81 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 3.83 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 6.75 (sa, 2H, NH<sub>2</sub>); 6.89 (d, 1H, H<sub>5'</sub>, J = 8.00); 7.03 (dd, 1H, H<sub>6'</sub>, J<sub>1</sub> = 1.00, J<sub>2</sub> = 8.00); 7.18 (d, 1H, H<sub>2'</sub>, J = 1.00); 7.18 (s, 1H, H<sub>6</sub>); 7.55 (s, 1H, H<sub>9</sub>); 9.46 (sa, 1H, OH). **RMN <sup>13</sup>C, DMSO<sub>d6</sub>, δ ppm:** 31.04 (C<sub>5</sub>); 56.42 (OCH<sub>3</sub>); 56.64 (OCH<sub>3</sub>); 60.27 (OCH<sub>3</sub>); 85.97 (C<sub>3</sub>); 113.35; 113.44; 116.11; 117.67 (CN); 122.18; 123.31; 126.97; 134.09; 138.67; 145.55; 148.00; 148.19; 150.49; 154.09; 162.31; 162.44.

**2-amino-6, 7-dimetoxi-4-(3', 5'-dimetoxi-4'-hidroxi)fenil-5,6-dihidroindeno[1,2-b]piridina-3-carbonitrilo KC2-43.**



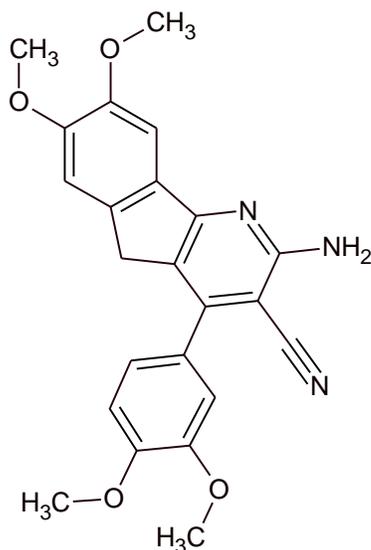
**Rendimiento:** 76%. **P.f.:** 246-248 °C. **IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ):** 3424-3334 ( $\text{NH}_2$ ), 2208 (CN), 1609, 1558, 1500. **RMN  $^1\text{H}$ ,  $\text{DMSO}_{d6}$ ,  $\delta$  ppm:** 3.75 (s, 2H,  $\text{H}_{5a}$  y  $\text{H}_{5b}$ ); 3.80 (s, 6H,  $\text{OCH}_3$ ); 3.81 (s, 6H,  $\text{OCH}_3$ ); 3.87 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ); 6.75 (sa, 2H,  $\text{NH}_2$ ); 6.89 (s, 2H,  $\text{H}_{6'}$  y  $\text{H}_{2'}$ ); 7.22 (d, 1H,  $\text{H}_8$ ,  $J = 8.20$ ); 7.31 (d, 1H,  $\text{H}_9$ ,  $J = 8.20$ ); 8.81 (sa, 1H, OH). **RMN  $^{13}\text{C}$ ,  $\text{DMSO}_{d6}$ ,  $\delta$  ppm:** 31.25 ( $\text{C}_5$ ); 56.65 ( $\text{OCH}_3$ ); 56.87 ( $\text{OCH}_3$ ); 60.27 ( $\text{OCH}_3$ ); 86.11 ( $\text{C}_3$ ); 107.02 ( $\text{C}_{2'}$  y  $\text{C}_{6'}$ ); 113.38 ( $\text{C}_8$ ); 117.67 ( $\text{C}_9$ ); 118.57 (CN); 123.40; 126.01; 134.11; 137.19; 138.64; 145.61; 148.49; 150.72; 154.10; 162.26 ( $\text{C}_1$ ); 162.44 ( $\text{C}_{9b}$ ).

**2-amino-7, 8-dimetoxi-4-(2', 4'-dimetoxi)fenil-5,6-dihidroindeno[1,2-b]piridina-3-carbonitrilo KC2-44.**



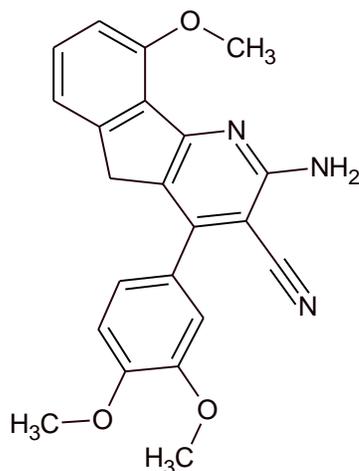
**Rendimiento:** 78%. **P.f.:** 240-242 °C. **IR (KBr, cm<sup>-1</sup>):** 3472-3296 (NH<sub>2</sub>), 2208 (CN), 1596, 1571. **RMN <sup>1</sup>H, DMSO<sub>d6</sub>, δ ppm:** 3.76 (s, 2H, H<sub>5a</sub> y H<sub>5b</sub>); 3.80 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 3.83 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 3.84 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 6.64 (sa, 2H, NH<sub>2</sub>); 6.64-6.74 (m, 2H, H<sub>5'</sub> y H<sub>3'</sub>); 7.17 (s, 1H, H<sub>6</sub>); 7.26 (d, 1H, H<sub>6'</sub>, J = 8.40); 7.30 (s, 1H, H<sub>9</sub>). **RMN <sup>13</sup>C, DMSO<sub>d6</sub>, δ ppm:** 31.25 (C<sub>5</sub>); 55.94 (OCH<sub>3</sub>); 56.10 (OCH<sub>3</sub>); 56.30 (OCH<sub>3</sub>); 87.10 (C<sub>3</sub>); 99.39; 103.80; 105.85; 109.11; 117.35 (C<sub>9</sub>); 118.28 (CN); 125.15; 131.29; 132.44; 139.81; 147.21; 149.46; 151.64; 157.76; 161.83; 161.99 (C<sub>1</sub>); 162.78 (C<sub>9b</sub>).

**2-amino-7, 8-dimetoxi-4-(3', 4'-dimetoxi)fenil-5,6-dihidroindeno[1,2-b]piridina-3-carbonitrilo KC2-45.**



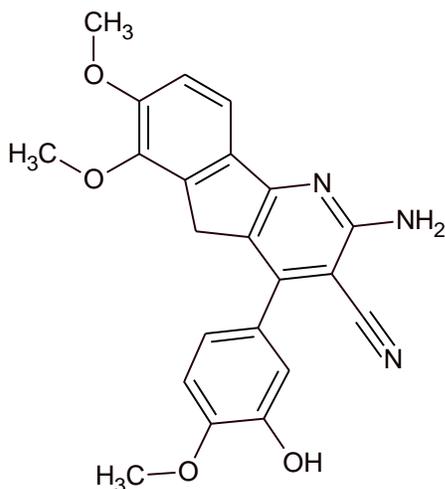
**Rendimiento:** 80%. **P.f.:** 234-236 °C. **IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ):** 3312 ( $\text{NH}_2$ ), 2208 (CN), 1635, 1552. **RMN  $^1\text{H}$ ,  $\text{DMSO}_{d6}$ ,  $\delta$  ppm:** 3.35 (s, 2H,  $\text{H}_{5a}$  y  $\text{H}_{5b}$ ); 3.66 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ); 3.81 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ); 3.82 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ); 3.84 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ); 6.76 (sa, 2H,  $\text{NH}_2$ ); 7.09 (d, 1H,  $\text{H}_5$ ); 7.15 (dd, 2H,  $\text{H}_2$  y  $\text{H}_6$ ); 7.22 (s, 1H,  $\text{H}_6$ ); 7.32 (s, 1H,  $\text{H}_9$ ). **RMN  $^{13}\text{C}$ ,  $\text{DMSO}_{d6}$ ,  $\delta$  ppm:** 31.25 ( $\text{C}_5$ ); 56.09 ( $\text{OCH}_3$ ); 56.27 ( $\text{OCH}_3$ ); 85.18 ( $\text{C}_3$ ); 103.78 ( $\text{C}_9$ ); 108.99 ( $\text{C}_6$ ); 112.17 ( $\text{C}_2$  y  $\text{C}_6'$ ); 112.83 ( $\text{C}_5$ ); 118.67 (CN); 121.87; 123.88; 128.55; 132.32; 140.23; 149.06; 149.44; 149.98; 162.34 ( $\text{C}_1$ ); 163.22 ( $\text{C}_{9b}$ ). **Anal. Calcd.** para  $\text{C}_{23}\text{H}_{21}\text{O}_4\text{N}_3$ : C 68.47 %, H 5.25 %, N 10.42 %; encontrado: C 68.51 %, H 5.34 %, N 10.75 %.

**2-amino-9-metoxi-4-(3', 4'-dimetoxi)fenil-5,6-dihidroindeno[1,2-b]piridina-3-carbonitrilo KC2-48.**



**Rendimiento:** 90%. **P.f.:** 218-220 °C. **IR (KBr, cm<sup>-1</sup>):** 3440-3328 (NH<sub>2</sub>), 2208 (CN), 1593, 1504. **RMN <sup>1</sup>H, DMSO<sub>d6</sub>, δ ppm:** 3.73 (s, 2H, H<sub>5a</sub> y H<sub>5b</sub>); 3.81 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 3.83 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 3.91 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 6.65 (sa, 2H, NH<sub>2</sub>); 7.09 (d, 1H, H<sub>5</sub>, *J* = 8.18); 7.16 (m, 4H, H<sub>6</sub>, H<sub>8</sub>, H<sub>2</sub>, H<sub>6'</sub>); 7.41 (t, 1H, H<sub>7</sub>, *J* = 7.80). **RMN <sup>13</sup>C, DMSO<sub>d6</sub>, δ ppm:** 33.96 (C<sub>5</sub>); 56.11 (OCH<sub>3</sub>); 56.29 (OCH<sub>3</sub>); 85.72 (C<sub>3</sub>); 103.78; 110.58; 112.22; 112.85; 118.12 (CN); 118.42; 121.85; 123.66; 127.54; 128.57; 131.70; 148.89; 149.09; 149.96; 157.02; 161.97 (C<sub>1</sub>); 163.93 (C<sub>9b</sub>).

**2-amino-6,7-dimetoxi-4-(3'-hidroxi-4'-metoxi)fenil-5,6-dihidroindeno[1,2-b]piridina-3-carbonitrilo KC2-56.**



**Rendimiento:** 89%. **P.f.:** 272-274 °C. **IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ):** 3376 ( $\text{NH}_2$  y OH) 2208 (CN), 1555, 1497. **RMN  $^1\text{H}$ ,  $\text{DMSO}_{d6}$ ,  $\delta$  ppm:** 3.59 (s, 2H,  $\text{H}_{5a}$  y  $\text{H}_{5b}$ ); 3.82 (s, 6H,  $\text{OCH}_3$ ); 3.83 (s, 6H,  $\text{OCH}_3$ ); 3.85 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ); 6.75 (sa, 2H,  $\text{NH}_2$ ); 7.01 (m, 3H,  $\text{H}_6$ ,  $\text{H}_5'$  y  $\text{H}_2$ ); 7.21 (d, 1H,  $\text{H}_8$ ,  $J = 8.20$ ); 7.31 (d, 1H,  $\text{H}_9$ ,  $J = 8.20$ ); 9.31 (sa, 1H, OH). **RMN  $^{13}\text{C}$ ,  $\text{DMSO}_{d6}$ ,  $\delta$  ppm:** 33.62 ( $\text{C}_5$ ); 56.14 ( $\text{OCH}_3$ ); 56.29 ( $\text{OCH}_3$ ); 86.11 ( $\text{C}_3$ ); 103.75 ( $\text{C}_9$ ); 108.99 ( $\text{C}_8$ ); 112.56; 116.28; 118.65 (CN); 120.39; 123.58; 128.70; 132.32; 140.12; 146.91; 148.95; 149.46; 151.63; 162.24 ( $\text{C}_1$ ); 163.00 ( $\text{C}_{9b}$ ). **Anal. Calcd.** para  $\text{C}_{22}\text{H}_{19}\text{O}_4\text{N}_3$ : C 67.86 %, H 4.92 %, N 10.79 %; encontrado: C 68.01 %, H 4.97 %, N 10.93 %.

### **4.3. Sección Biológica**

#### **4.3.1. Actividad citotóxica-antitumoral**

En la evaluación de la actividad citotóxica-antitumoral de los nuevos compuestos sintetizados se incluyeron los siguientes ensayos:

##### **4.3.1.1. Efecto de los compuestos KC sobre la viabilidad y el crecimiento celular.**

Una placa de microtitulación de 96 pozos conteniendo 0,1 ml de medio de cultivo (RPMI) / pozo se sembró con células de tumor de próstata  $5 \times 10^3$  PC-3,  $1.2 \times 10^4$  LNCaP o  $5 \times 10^2$  MatLyLu. Después de 24h de cultivo, las células fueron expuestas a los compuestos KC por 72h en un rango de concentraciones de 5 a 100  $\mu\text{g/mL}$ , y luego evaluadas para su citotoxicidad. Los compuestos fueron disueltos en dimetilsulfoxido (DMSO). La concentración final de este solvente en el medio de cultivo fue siempre menor que 0,2%, una concentración que no tiene ni efecto citotóxico, ni causa ninguna interferencia con el método de detección colorimétrica. Los efectos dependientes de la dosis de cada compuesto sobre la viabilidad celular se llevaron a cabo por colorimetría después de la reducción de una sal tretazol del ácido benceno sulfónico (sodio 3 - [1 - (fenilaminocarbonil) -3,4-tetrazolio]-bis (4-metoxi-6-nitro ) hidrato (XTT). Después de 72 horas de incubación del compuesto, las células fueron incubadas con XTT a 37 ° C por 4 horas y la detección colorimétrica del producto naranja formazán se registró a 492 nm (Spectra Fluor-Tecan ). El valor citotóxico de  $CI_{50}$  obtenidos con el ensayo XTT se definió como la

concentración de los compuestos ensayados que resulta en una reducción del 50% de la viabilidad en comparación con las células tratadas con vehículo. Todos los experimentos se realizaron por triplicado. El compuesto más activo (citotóxico) fue seleccionado para futuros ensayos usando los valores  $CI_{50}$  obtenidos en esta evaluación.

El efecto dependiente del tiempo de los mejores compuestos KC sobre el crecimiento celular fue medido acorde a un procedimiento previo descrito. Las células PC-3 ( $1 \times 10^5$ ), LNCaP ( $2,4 \times 10^5$ ) y MatLyLu ( $1,5 \times 10^4$ ) se sembraron en placas de 6 pozos en medio RPMI con 10% de suero fetal bovino (SFB) y el compuesto a su  $CI_{50}$  citotóxica ( $37^\circ\text{C}$ , 95%  $\text{O}_2$ , 5%  $\text{CO}_2$ ). Las células se colectaron desde placas de cultivo después del tratamiento con tripsina-EDTA por 7 min a  $37^\circ\text{C}$  y el número de células viables por pozo fue contada con un hemocitometro en intervalos de 24h por un periodo de 96h. Todos los experimentos se realizaron por triplicado.<sup>69</sup>

#### **4.3.1.2. Ensayo de adhesión celular.**

Las mediciones se realizaron con el nuevo xCELLigence Analizador de tiempo Real de la célula de Ciencias Aplicadas Roche, Mannheim, Alemania. Este sistema supervisa el estado biológico de las células como el número de células y la adhesión mediante la medición de la impedancia eléctrica a través de microelectrodos colocados en la parte inferior de un tejido especial en placas de 96 pozos. El analizador de forma automáticamente mide la impedancia eléctrica como el índice celular (CI), el cual es transferido, analizado y procesado por el

software integrado. En este contexto, dentro de las mismas condiciones fisiológicas, si hay más células agregadas a los electrodos en el plato, el valor de impedancia es más grande conduciendo a un mayor número de CI. Los resultados se expresan como CI y el agregación y difusión relativa. Para las mediciones, los 96 pozos de la placa ACEA E<sup>®</sup> fueron recubiertas con fibronectina (20µg/ml, 1 h, 37 ° C). Las placas fueron lavadas con buffer fosfato salino (PBS) y recubiertos con una solución de albúmina sérica bovina en PBS (0,5%) (20 min, 37 ° C) después de que cada pozo se lavó con PBS. Se añadió 50 µl de medio para registrar los antecedentes y luego de 100 µl de suspensión de células PC-3 (5x10<sup>5</sup> células) fue transferido a cada pozo de la placa ACEA E<sup>®</sup> y 50 µl del compuesto KC más activo a su IC<sub>50</sub> citotóxica se ha añadido. La adhesión y la diseminación de las células fueron monitoreadas continuamente cada minuto usando este sistema electrónico de detección en tiempo real celular, de acuerdo con las instrucciones del fabricante por un período de hasta 4 h.

#### **4.3.1.3. Evaluación de la migración e invasión celular.**

La migración celular fue ensayada utilizando la prueba de raspado y reparación de la herida. Las células PC-3 (8x10<sup>4</sup>) se cultivaron hasta confluencia en placas de 24 pozos (48 h, 37 ° C). Una punta de micropipeta esterilizada fue usada para introducir una herida a través de la monocapa de células enteras y el medio de comunicación fue removido. Después lavar con PBS, el compuesto KC más activo a su CI<sub>50</sub> citotóxica se añadió en el medio fresco y se incubó durante 24 h en presencia del factor de crecimiento endotelial (1 pg / ml). Los

cubre objetos se colocaron en un microscopio de luz. Las imágenes de las heridas fueron capturados en un sistema computarizado usando una cámara digital inmediatamente después de hacer la herida (0 h) y después de 24 h de incubación. Los resultados se expresaron como porcentaje de cierre de la herida y el número de células que migra/mm<sup>2</sup>.

Para el ensayo de invasión celular las células tumorales humanas LNCaP ( $1 \times 10^5$  cells/mL) fueron pretratadas con el compuesto KC más activo a su  $CI_{50}$  citotóxica por 24h. Las células tratadas se sembraron en la parte superior de la cámara de Boyden (membrana recubierta con Matrigel) en 50  $\mu$ L de medio libre de suero y se incubaron durante 18 horas a 37 ° C. La parte inferior de la cámara contiene 500  $\mu$ l de medio estándar con 20% de SFB. Las células que habían invadido la superficie inferior de la cámara se hicieron reaccionar con calceína (4 $\mu$ g/ml) en solución tampón Sal de Hank (HBSS) durante 1 hora a 37 ° C. La Fluorescencia de células invadidas se leyó a 485 / 530.

#### **4.3.1.4. Efecto de los compuestos KC sobre la actividad de las MMP.**

Las actividades gelatinolítica de MMP-2 y MMP-9 en el medio de cultivo condicionado se analizaron por electroforesis en geles de poliacrilamida al 10% que contenía 1 mg/ml de gelatina. En resumen, las células PC-3 y LNCaP (80% confluentes en placas de 6 pozos) fueron lavadas dos veces con PBS y tratadas con los compuestos a su  $CI_{50}$  citotóxica en 2,5 ml de medio libre de suero (24 horas a 37 ° C en un ambiente húmedo del 95% de O<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub> al 5%). Una mezcla de 20 $\mu$ L compuesta por el medio condicionado y la muestra bufereada

(sin B-mercaptoetanol, 0.75:0.25) fueron sometidos a electroforesis en gel de poliacrilamida copolimerizada en un 10% de SDS con 1 mg/ml de gelatina como sustrato. Después la electroforesis se completó a 100 V, el gel se lavó con 2% de solución de Triton X-100 para eliminar el SDS y se incubaron en un bufer de activación (50 mM TrisHCl pH 7.4, 0.2 mM de NaCl, 10 mM de CaCl<sub>2</sub>) por 20h a 37 ° C. Los geles fueron luego teñidos con 0.5% Coomassie azul brillante y con ácido acético-metanol-agua (10:40:50). Las zonas de no-tinción del gel correspondiente a la actividad de gelatinasa se cuantificaron utilizando el software para Windows Image J. La proteína pura humana MMP-9 y MMP-2 se utilizaron como control positivo.

#### **4.3.1.5. Efecto de los compuestos KC sobre la angiogénesis en membrana corioalantoica de pollo (CAM).**

Los huevos fertilizados de pollo fueron criados en una incubadora a 37 °C a humedad constante por 3 días. Después del tercer día, una ventana cuadrada fue cortada en la cáscara de cada huevo para asegurar un embrión de vida y 5 ml de albúmina fueron removidos para permitir la separación de la membrana corioalantoidea en desarrollo de la cáscara. La ventana fue sellada con cinta adhesiva, y los huevos fueron criados en el incubador por 7 días adicionales. El día 11, las cintas fueron retiradas y la CAM fueron tratadas con los diferentes compuestos. En resumen, dos pequeños anillos fueron colocados dentro de la CAM y uno u otro 100µL de vehículo (control negativo) o 100µL del compuesto KC más activo a su Cl<sub>50</sub> más alta en el ensayo citototoxicidad fueron adicionados a las dos líneas celulares. Después de 72 horas las CAM fueron

examinadas y las imágenes en vivo fueron tomadas con un estereomicroscopio equipado con un sistema de cámara digital Kappa. La respuesta al tratamiento con los compuestos se evaluó por examinación de las alteraciones de la CAM a diferencia de los controles.

#### **4.3.1.6. Medición del potencial clonogénico.**

Para la prueba del crecimiento independiente del anclaje las células se cultivaron en agar 0.6%. En resumen, una stock de 1,2% de agar Noble (Gibco) fue autoclavado y la solución equilibrada a 37°C durante 60 minutos. El agar se diluyó en medio RPMI (1:1) y un mililitro de la mezcla se añadió a cada pozo de una placa de 6 pozos para formar una capa basal la cual fue dejada solidificar por 15 minutos a 4°C antes de volver a equilibrar a temperatura ambiente por 30 minutos. Las células PC-3 y LNCaP ( $1 \times 10^5$ ) suspendidas en medio RPMI completado con FBS al 20% que contiene 0,3% de agar noble se superpone en la capa inferior semi-sólida. Las placas se mantuvieron a temperatura ambiente durante aproximadamente 15 minutos y se incubaron durante 24 h (37 °C, 95% de O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> al 5%). Al día siguiente, un mililitro de medio con el compuesto KC más activo a su concentración  $CI_{50}$  citotóxica se añadió a cada pozo. Después de 2 semanas de incubación, las células se tiñeron con cristal violeta (0,01%) por 18 horas a 37 °C. Las fotografías fueron tomadas con microscopio de luz. Tres series de experimentos, se realizaron por triplicado.

#### **4.3.1.7. Efecto toxicológico de los compuestos KC en *Artemia salina*.**

El bioensayo de toxicidad en *Artemia salina* se realizó de acuerdo a una modificación del método descrito por McLaughlin. En resumen, el agua de mar artificial fue preparado disolviendo la sal del mar en agua destilada (38,0 g / L). El agua de mar y una cucharadita de huevos de *Artemia* se han añadido a un pequeño tanque cubierto a la mitad. El otro lado del tanque no fue cubierto para permitir que la luz atrajera a los camarones nacidos. El tanque que contiene los huevos de *Artemia* se dejó a temperatura ambiente por 24 horas para permitir que los huevos salgan del cascaron. El compuesto más activo KC se disolvió en DMSO y se diluyó con agua de mar artificial a fin de que la concentración final de DMSO no excedió el 0,05%. Las diferentes concentraciones (50 µl, 5000-5000 µg/ml) de los compuestos se prepararon, por triplicado, en placas de 96 pozos. Las larvas de *Artemia salina* (*nauplii*, 10-20, 150 µl) fueron adicionadas a cada pozo y luego cubiertas con parafilm a temperatura ambiente por 24 h. Después de este período, el número de *Artemias* muertas y sobrevivientes se registró bajo la luz del microscopio. Cada experimento se repitió tres veces y los valores promedios fueron determinados. La toxicidad de cada compuesto se determinó a partir de los valores del 50% de concentración letal (CL<sub>50</sub>) para el ensayo de *Artemia salina* por análisis probit en el cual la mortalidad fue corregida por la mortalidad natural observada en los controles negativos usando la formula Abbott's,  $p = \frac{pi-C}{1-C}$ , donde  $pi$  denota la tasa de control de mortalidad observada y  $C$  el promedio de la mortalidad natural en las *Artemias* tratadas. Los resultados se expresan como concentración letal media (CL<sub>50</sub>) y la

relación de toxicidad antitumoral (TAR) se define por el valor resultante de la  $CL_{50}$  dividida por los valores  $CI_{50}$  citotóxica de los correspondientes compuestos KC para las células PC-3, LNCaP o MatLyLu.

#### **4.3.1.8. Análisis estadístico**

El análisis estadístico se realizó mediante la t de Student y la prueba ANOVA de una ruta utilizando el programa SPSS versión 17.0 (SPSS, Chicago, IL). Valores de  $p < 0,05$  fueron considerados significativos.

#### **4.3.2. Actividad Tripanocida**

##### **4.3.2.1. Parásitos**

Dos cepas de *T. cruzi* Mexicanas se utilizaron en esta investigación: Ninoa aislados de casos pediátricos agudos de Oaxaca, y la cepa INC-5 fue aislada de casos crónicos, las mujeres de Guanajuato. Ambas cepas se mantienen en sí en el Laboratorio en el vector *Meccus pallidipennis* (Insecta: Hemiptera) y mediante pases sucesivos en ratones hembra NIH de 25 a 30 g.

##### **4.3.2.2. Ensayo biológico**

Los 16 compuestos se evaluaron in vitro contra las formas tripomastigotes sanguíneos de *T. cruzi* (cepa Ninoa y CIN-5). Los bioensayos se realizaron con la sangre infectada de ratones NIH hembra colectada por punción cardíaca en el pico de parasitemia ( $4 \times 10^6$  parásitos/ml). La heparina se utiliza como anticoagulante. La sangre infectada se diluyó con solución salina estéril para obtener una concentración final de  $1 \times 10^6$  tripomastigotes/ml.

Las soluciones de stock de los compuestos ensayados a una concentración de 10 mg/ml se preparan disolviendo en 1 ml de DMSO. Diluciones seriadas con agua estéril se realizan hasta obtener la concentración requerida. Pruebas de los compuestos se realizaron en placas de 96 pozos. A cada pozo conteniendo 195  $\mu$ L de la suspensión tripomastigotes, 5  $\mu$ L de la solución del compuesto se añadió resultando en una concentración final de 100, 50, 10 y 5 mg/mL (la concentración final de DMSO fue inferior al 1% en todos los casos). Las placas fueron incubadas a 4 ° C durante 24 h. Después la actividad tripanocida se determinó según el método descrito por Brener, la concentración del parásito fue evaluada por conteo de las formas tripomastigotes usando un microscopio óptico con un aumento de 40X. La reducción de la concentración de parásitos (lisis del parásito) se determinó en comparación con los parásitos no tratados. El control negativo consistió en la sangre infectada, sin ningún tipo de aditivo con la misma concentración de etanol. Nifurtimox y benznidazol se utilizaron como controles positivos. Todos los experimentos se realizaron por triplicado y se determinó la actividad. La Actividad tripanosomicida se expresa en función de la lisis de los flagelados después del tiempo de Incubación en comparación con el grupo control.<sup>70,71</sup>

#### **4.4. Sección Modelado Molecular**

En el presente estudio se utilizaron las series de compuestos KC, cuyas estructuras se muestran previamente.. Los cálculos se realizaron utilizando el software de la compañía CAChe Scientific versión 4.1.1.

Se construyeron los modelos tridimensionales de las indenopiridinas i benzoquinolinas sustituidas objeto del presente estudio, utilizando el editor molecular del sistema CAChe, a partir de los datos de la estructura cristalina de KC3-58. Estas estructuras sirvieron como puntos iniciales para un análisis conformacional exhaustivo de cada compuesto, para definir sus posibles requerimientos para unirse al receptor. Inicialmente se minimizó cada estructura utilizando mecánica molecular. Con el fin de obtener conformaciones lo más cercanas posible al mínimo global, se realizaron simulaciones de dinámica molecular. los cálculos se realizaron a 300 K por 1000 ps, con un intervalo de tiempo de 1.0 fs. Se analizaron los archivos de trayectoria obtenidos y se seleccionaron en cada caso las conformaciones de menor energía. Estas conformaciones fueron minimizadas utilizando mecánica molecular y se escogió la conformación de menor energía. Este procedimiento se repitió para cada uno de los compuestos.

Las conformaciones de menor energía de cada uno de los compuestos se utilizaron para generar la hipótesis del farmacóforo, utilizando el software GALAHAD Sybil 8.1. (Genetic Algorithm with Linear Assignment of Hypermolecular Alignment of Datasets). Esto se realizó en dos etapas

principales: los ligandos son alineados entre sí en el interior un espacio de coordenadas, y las conformaciones producidas se alinean en el espacio cartesiano. La primera etapa es totalmente flexible, mientras que la segunda trata las moléculas como cuerpos rígidos. La alineación inicial en el espacio torsional se lleva a cabo por un algoritmo genético (GA), que opera en un conjunto de modelos individuales, donde cada modelo se define por una serie de torsiones para cada ligando. Las torsiones se aplican a la estructura de la base de cada ligando para generar una conformación para el ligando correspondiente y así generar múltiples modelos farmacofóricos

En el segundo paso el programa identifica las características correspondientes de los ligandos emparejándolos en base a una similaridad estructural y los filtros basados en coherencia geométrica, y se fusionan en una sola hipermolécula.

Una vez generado el conjunto de modelos finalmente se procede a seleccionar el modelo de la hipótesis.

## 6. Conclusiones

En este trabajo de investigación se describió una nueva estrategia para el descubrimiento de nuevos fármacos, para la cual se sintetizaron con éxito 51 compuestos de las dos familias **KC2** y **KC3**, con el objetivo de ensayarlos en dos dianas farmacológicas como, la angiogénesis en Cáncer y el metabolismo de *T. cruzi*; para así obtener la optimización de una serie y contribuir con aquellas enfermedades conocidas como desatendidas. Nosotros descubrimos que los compuestos sintetizados son inhibidores selectivos de la metaloproteínasa MMP-9 siendo el más activo **KC3-15** y planteamos como requerimientos estructurales necesarios para la optimización de una serie la presencia de tres grupos hidrofóbicos, tres grupos aceptores de protones y tres donadores de protones, observándose la importancia del grupo nitrilo como aceptor de protones para la interacción con la proteína, así como de la presencia de los grupos hidroxilo como donadores de protones mejoran la actividad biológica, lo cual se correlaciona con los resultados obtenidos in vitro. Por otra parte además, de haber realizado las pruebas citotóxicas-antitumorales ensayamos estos compuestos como antiparasitarios. Sorpresivamente, encontramos excelentes actividades anti *T. cruzi* en ambas series de compuestos a concentraciones mucho menores que las encontradas en cáncer siendo los más activos **KC2-16**, **KC2-26**, **KC3-15** y **KC3-17** y con actividad biológica importante en cepas resistentes comparados con los fármacos de referencia nifurtimox y Benznidazol. En vista de conocer un posible mecanismo de acción, realizamos un estudio de hipótesis del fármacóforo dirigido hacia la

inhibición de la síntesis de ergosterol, encontrando que a pesar de algunas similitudes estructurales con el compuesto **4**, el cual fue previamente descubierto con actividad contra dos enzimas, la enzima humana PFT y lanosterol 14 $\alpha$ -demetilasa de *T. cruzi* nuestros compuestos no mostraron similitudes estructurales con respecto a los fármacos que inhiben la síntesis de ergosterol en *T. cruzi*. Sin embargo, debido a la similitud del grupo fenil sobre la posición 4 en estos sistemas con respecto al mismo grupo presente en el etopósido proponemos un posible mecanismo vía inhibición de la TOPII-ADN, a través de la formación de una quinona.

Nosotros somos optimistas en que la optimización de las series de compuestos, tales como **KC2** y **KC3**, son extremadamente prominentes para futuros desarrollos como candidatos clínicos para el cáncer y la enfermedad de Chagas.

En cuanto, al núcleo indeno pirano hemos llegado a la conclusión de que el poco éxito obtenido en su síntesis pudiera ser atribuida a la alta tensión a la cual está sometido el sistema tricíclico fusionado, por ello, proponemos en un futuro continuar con los estudios de condiciones de reacción para optimizar su obtención.

## 7. Recomendaciones y Sugerencias

- Se recomienda realizar un estudio de Docking de los compuestos KC2 y KC3 sobre la proteína MMP-9, y así poder analizar los requerimientos comunes de las estructuras de los compuestos y su interacción con la proteína.
- Se recomienda sintetizar más derivados hidroxilados para así establecer un estudio de relación estructura actividad biológica más amplio.
- Se recomienda continuar con los ensayos de actividad biológica antichagásica, y además se sugiere evaluar sus propiedades citotóxicas sobre macrófagos.

## 8. Bibliografía

1. Braña MF, Martín-Cantalejo Y, Migallón AS, Morán M. Parasitosis y Cáncer. An. R. Acad. Nac. Farm. 2008, 74: 29-50.
2. Rivas L, Moreno J, Cañavate C, Alvar J. Virulence and disease in leishmaniasis: what is relevant for the patient? Trends. Parasitol. 2004, 20: 297-301.
3. Harms G, Feldmeier H. The impact of HIV infection on tropical diseases. Infect. Dis. Clin. North Am. 2005, 19: 121-35.
4. Burton A. Sharing needles may produce artificial Leishmania cycle. Lancet Infect. Dis. 2001, 1: 4.
5. Reguera Rosa M, Perez-Pertejo Yolanda, Redondo Carmen M. *et al.* La ADN topoisomerasa tipo I de protozoos patógenos como Diana terapéutica de fármacos antitumorales. *Medicina (B. Aires)*, 2007, vol.67, no.6, supl.1, p.747-757.
6. Wang JC. DNA topoisomerases. Annu. Rev. Biochem. 1996, 65: 635-92.
7. Cheesman S, McAleese S, Goman M, Johnson D, Horrocks P, Ridley RG, *et al.* The gene encoding topoisomerase II from Plasmodium falciparum. Nucleic. Acids Res. 1994, 22: 2547-51.
8. Christopher LJ, Dykstra CC. Identification of a type II topoisomerase gene from Cryptosporidium parvum. J. Eukaryot. Microbiol. 1994, 41: 28S.
9. Strauss PR, Wang JC. The TOP2 gene of Trypanosoma brucei: a single-copy gene that shares extensive homology with other TOP2 genes

- encoding eukaryotic DNA topoisomerase II. *Mol. Biochem. Parasitol.* 1990, 38: 141-50.
10. a) Fragoso SP, Goldenberg S. Cloning and characterization of the gene encoding *Trypanosoma cruzi* DNA topoisomerase II. *Mol. Biochem. Parasitol.* 1992, 55: 127-34. b) Gantchev T, Hunting D. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1997, 237: 24-27
11. Das A, Dasgupta A, Sharma S, Ghosh M, Sengupta T, Bandopadhyay S, et al. Characterization of the gene encoding type II DNA topoisomerase from *Leishmania donovani*: a key molecular target in antileishmanial therapy. *Nucleic Acids Res.* 2001, 29: 1844-51.
12. Hanke T, Ramiro MJ, Trigueros S, Roca J, Larraga V. Cloning, functional analysis and post-transcriptional regulation of a type II DNA topoisomerase from *Leishmania infantum*. A new potential target for anti-parasite drugs. *Nucleic Acids Res.* 2003, 31: 4917-28.
13. Villa H, Otero-Marcos AR, Reguera RM, et al. A novel active DNA topoisomerase I in *Leishmania donovani*. *J. Biol. Chem.* 2003, 278: 3521-26.
14. Bodley AL, Chakraborty AK, Xie S, Burri C, Shapiro TA. An unusual type IB topoisomerase from African trypanosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2003, 100: 7539-44.
15. Das A, Dasgupta A, Sengupta T, Majumder HK. Topoisomerases of kinetoplastid parasites as potential chemotherapeutic targets. *Trends Parasitol.* 2004, 20: 381-7.

16. Balaña-Fouce R, Redondo CM, Pérez-Pertejo Y, Díaz- González R, Reguera RM. Targeting atypical trypanosomatid DNA topoisomerase I. *Drug Discov. Today* 2006, 11: 733-40.
17. Reguera RM, Redondo CM, Gutiérrez de Prado R, Pérez- Pertejo Y, Balaña-Fouce R. DNA topoisomerase I from parasitic protozoa: a potential target for chemotherapy. *Biochim. Biophys. Acta* 2006, 1759: 117-31.
18. Pizzolato JF, Saltz LB. The camptothecins. *Lancet* 2003, 361: 2235-42.
19. Adams DJ. The impact of tumor physiology on camptothecin- based drug development. *Curr. Med. Chem. Anticancer Agents* 2005, 5: 1-13.
20. Bodley AL, Shapiro TA. Molecular and cytotoxic effects of camptothecin, a topoisomerase I inhibitor, on trypanosomes and Leishmania. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1995, 92: 3726-30.
21. Bodley AL, Cumming JN, Shapiro TA. Effect of camptothecin, a topoisomerase I inhibitor on Plasmodium falciparum. *Biochem. Pharmacol.* 1998, 55: 709-11.
22. Bodley AL, Wani MC, Wall ME, Shapiro TA. Antitrypanosomal activity of camptothecin analogs. Structureactivity correlations. *Biochem Pharmacol* 1995, 50: 937- 42.
23. Kraus J, Tatipaka HB, McGuffin SA, Chennamaneni NK, Karimi M, Arif J, Verlinde C, Buckner FS, Gelb MH. Second Generation Analogues of the Cancer Drug Clinical Candidate Tipifarnib for Anti-Chagas Disease Drug Discovery. *J. Med. Chem.* 2010, 53: 3887–98.

24. Morán PV, Fagundo Juan CJ, Llanes A Olga, Ramírez H Porfirio. Nuevas estrategias en el tratamiento de la Leucemia Mieloide Crónica. Rev. Cubana Hematol. Inmunol. Med. Tranf. [Revista en Internet]
25. Angibaug Patrick René y Venet Marc Gastón, inventores; janssen Pharmaceutical N. V., titular. Derivados de quinazolina y quinolina 4-sustituidos que inhiben la farnesil transferasa. Patente Europea. ES 2 260 316 T3. BOPI: 1.11.2006
26. Kraus, JM, Verlinde, CLMJ, Karimi M, Lepesheva GI, Gelb HM, Buckner FS. Rational Modification of a Candidate Cancer Drug for Use Against Chagas Disease. J. Med. Chem. 2009, 52: 1639-47.
27. WHO. Cancer. [Internet]. World Health Organization. 2009. [citado 12 Nov. 2009]. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>.
28. Murray AW. Creative blocks; cell-cycle checkpoints and feedback controls. Nature 1992, 359: 599-04.
29. Capote LG. Frecuencia del cáncer en Venezuela. Badan; 2008; 1-4.
30. Capote N, Luis G. Aspectos epidemiológicos del cáncer en Venezuela. Rev. Venez. Oncol. 2006, 18: 269-81.
31. Kumar V, Abbas AK, Fausto N Robbins y Cotran. Patología Estructural y Funcional. [Libro en Internet]. 7<sup>a</sup> Edición, Madrid: Elsevier; 2005. [citado 10 Nov. 2009]. Disponible en: <http://books.google.co.ve/books?id=i2o24JW40wAC&pg=PA294&dq=ciclo+celular#v=onepage&q=ciclo%20celular&f=false>.

32. Fishel R, Lescoe MK, Rao MRS, Copeled NG, Jenkins NA, Garber J. The human mutator gene homolog MSH2 and its association with hereditary nonpolyposis colon cancer. *Cell* 1993, 75:1027-38.
33. Peralta-Zaragosa O, Bahena-Román M, Díaz-Benítez C, Madrid-Marina V. Regulación del ciclo celular y desarrollo de cancer: perspectivas terapéuticas. *Salud Pública Méx.* [revista en internet]; 1997 [citado 12 Nov. 2009]; 39(5), 451-462. Disponible en: <http://www.insp.mx/rsp/articulos/articulo.php?id=000756>.
34. Martin de Civetta, M. Carcinogénesis. Disponible en: [med.unne.edu.ar/catedras/cirugia\\_i/clases/carcinog.PDF](http://med.unne.edu.ar/catedras/cirugia_i/clases/carcinog.PDF)
35. Silverman B, Richard. *The Organic Chemistry of Drug Design and Drug Action*. 2<sup>da</sup> Edición. Amsterdam. Elsevier. 2004.
36. Siemann DW, Bibby MC, Dark GG, et. al.; Differentiation and definition of vascular target therapies. *Clin. Cancer Res.* 2005, 11; 416-20.
37. Gaya AM, Rustin GJ. Vascular Disrupting agents: a new class of drug in cancer therapy. *Clin. Oncol.* 2005, 17; 277-90
38. Mahindro N, Liou JP, Chang JY, Hsieh HP. Antitubulin agents for the treatment of cancer-a medicinal chemistry update. *Expert. Opin. Ther. Patents* 2006, 16; 647-691.
39. WHO. Chagas [Internet]. [Citado 12 Nov. 2009]. World Health Organization. Disponible en: <http://apps.who.int/tdr/svc/diseases/chagas>
40. Carlier Yves. Chagas Disease (American Trypanosomiasis) [Internet]. eMedicine. [Citado 12 Nov. 2009]. Disponible en: <http://emedicine.medscape.com/article/214581-overview>

41. Kirchhoff LV. "American trypanosomiasis (Chagas disease)-a tropical disease now in the United States." N. Engl. J. Med. 1993, 329: 639-44.
42. Levine ND, Corliss JO, Cox PEG. A newly revised classification of the protozoa. J. Protozool 1980, 27: 37-58.
43. Hoare CA, Wallace FG. Developmental stages of trypanosomatid flagellates: A new terminology. Nature 1966, 212: 1385-86
44. Tripanosoma cruzi, el invasor [En Internet]. [citado 12 Nov. 2009] Disponible en: <http://www.cienciahoy.org.ar/hoy02/trypanosoma.htm>
45. Guerrant, R.L. / Weller, P.F. / Walker, D. Enfermedades infecciosas tropicales. [En Internet]. 1<sup>a</sup> Edición. Madrid. Elsevier. 2002. [citado 12 Nov 2009]. Disponible en: <http://books.google.co.ve/books?id=qzv2f8GQepEC&pg=PA384&dq=enfermedad+de+chagas#v=onepage&q=enfermedad%20de%20chagas&f=false>
46. Tarleton RJ. Parasite persistence in the a etiology of Chagas disease. Int. J. Parasitol. 2001, 31: 550-54.
47. Maya JD Repetto, Y., Agosin, M., Ojeda, J.M., Tellez, R., Gaule, C. and Morello, A. Effects of Nifurtimox and Benznidazole upon glutathione and trypanothione in epimastigote, trypomastigote and amastigote forms of Trypanosoma cruzi. Mol. Biochem. Parasitol. 1997, 86: 101–06
48. Rodríguez Coura J, De Castro SL. A critical review on Chagas disease chemotherapy. Med. Inst. Oswaldo cruz. 2002, 97: 3-24.
49. García S, Ramos CO, Senra JFV, et. al. Treatment with benznidazole during the chronic phase of experimental Chagas disease decreases

- cardiac alterations. *Antimicrob. Agents and Chemother.* 2005, 49: 1521-28.
50. Duschak Vilma G, Couto Alicia S. An Insight on Targets and Patented Drugs for Chemotherapy of Chagas Disease. *Recent Patents on Anti-Infect. Drug Discov.* 2007, 2: 19-51.
51. Robert CW, McLeod R, Rice DW, Ginger M, Chance ML, Goad LJ. Fatty acid and sterol metabolism: potential antimicrobial targets in apicomplexan and trypanosomatid parasitic protozoa. *Mol. Biochem. Parasitol.* 2003, 126: 129-42.
52. Braga MV, Urbina JA, De Souza W. Effects of squalene synthase inhibitors on the growth and ultrastructure of *Trypanosoma cruzi*. *Int. J. Antimicrob. Agents* 2004, 24: 72-78.
53. Cazzulo JJ. Proteinases of *Trypanosoma cruzi*: potential targets for the chemotherapy of Chagas disease. *Curr. Top. Med. Chem.* 2002, 2: 1261-71
54. Eakin AE, Milla AA, Harth G, Mckerrow JH, Craik CS. The sequence, organization, and expression of the major cysteine proteinase (cruzain) from *Trypanmosoma cruzi*. *J. Biol. Chem.* 1992, 267: 7411-20.
55. Tocochowicz A, Maskos K, Huber R, Oltenfreiter R, Dive V, Yiotakis A, Zanda M, Bode W, Goeting P. Crystal Structures of MMP-9 Complexes with five inhibitors: Contribution of the flexible Arg424 side-chain to selectivity. *J. Mol. Biol.* 2007, 371: 989-06.
56. Shung-Xiang Z, Jun F, Kuo S, Brossi A, Hamel E, Lee KH. Antitumor Agents. 199. Three-Dimensional Quantitative Structure-Activity

- Relationship Study of the Colchicine Binding Site Ligands Using Comparative Molecular Field Analysis. *J. Med. Chem.* 2000, 43:167-76.
57. Cai, SX, Small molecule Vascular Disrupting Agents: Potential New Drugs for Cancer treatment. *Recent Patents on Anti-Cancer Drug Discov.* 2007, 2: 79-01
58. Hsieh HP, Liou JP. and Mahindroo N. Pharmaceutical design of antimetabolic agents based on combretastatins. *Curr. Pharm. Des.* 2005, 11:1655-77.
59. Nguyen TL, McGrath C, Hermone AR, Burnett JC, Zaharevitz DW, Day BW, Wipf P, Hamel E. and Gussio, R. A Common Pharmacophore for a Diverse Set of Colchicine Site Inhibitors Using a Structure-Based Approach. *J. Med. Chem.* 2005, 48, 6107-16.
60. Shung-Xiang Z, Jun F, Kuo S, Brossi A, Hamel E, Lee KH. Antitumor Agents. 199. Three-Dimensional Quantitative Structure-Activity Relationship Study of the Colchicine Binding Site Ligands Using Comparative Molecular Field Analysis. *J. Med. Chem.* 2000, 43:167-76.
61. Reguera RM, Redondo CM, Gutiérrez de Prado R, Pérez- Pertejo Y, Balaña-Fouce R. DNA topoisomerase I from parasitic protozoa: a potential target for chemotherapy. *Biochim. Biophys. Acta* 2006; 1759: 117-31.
62. Pouységu L, Sylla T, Garnier T, Rojas L, Charris J, Deffieux D, Quideau S. Hypervalent iodine-mediated oxygenative phenol dearomatization reactions. *Tetrahedron* 2010, 66: 5908-17
63. Jachak MN, Kendre DB, Avhale AB, Toche RB, Medhane VJ. Synthesis of novel benzochromene, benzoquinoline, benzochromenopyrimidine and

- pyrimidobenzoquinoline derivates. *Org. Prep. and Proc. Int.* 2006, 38: 313-24.
64. Kemnitzer W, Jiang S, Wang Y, Kasibhatla S, Bubenick M, Labrecque D, Cai SX. Discovery of 4-aryl-4H-chromenes as a new series of apoptosis inducers using a cell- and caspase-based HTS assay. Part 5: Modifications of the 2- and 3-positions. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2008, 18: 603-07.
65. Joshi KC, Dandia A, Sunita B, Joshi A. Studies in Spiroheterocycles. Part XVII. Synthesis of novel fluorine containing Spiroindole-pyranobenzopyran and Spiroindenopyran-indole derivates. *J. Heterocyclic Chem.* 1989, 26: 1907-99.
66. Karmakar B, Chowdhury B, Banerji J. Mesoporous titanosilicate Ti-Tud-1 catalyzed Knoevenagel reaction: an efficient green synthesis of trisubstituted electrophilic olefins. *Catal. Commun.* 2010, 11: 601-05
67. Yakaiah T, Reddy G, Lingaiah B, Shanthan R.  $ZrOCl_2 \cdot 8H_2O$  as a new solid phase and recyclable catalyst for an efficient Knoevenagel condensation under solvent-free microwave irradiation conditions. *Indian J. Chem. Sec B.* 2005, 44B: 1301-03.
68. Mata G. Síntesis y evaluación de compuestos análogos de arilcromenos y quinolinas con potencial actividad citotóxica-anticancerígeno y antimalárica. [Doctorado]. Caracas-Venezuela. Universidad Central de Venezuela. **2010.**

69. Denizot F, Lang R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J. Immunol Methods*. 1986, 89: 271-77.
70. Brener Z. Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 1962, 4: 389-96.
71. Cerecetto H, Gonzalez M. Anti-T-cruzi agents: Our experience in the evaluation of more than five hundred compounds. *Mini Rev. Med. Chem.* 2008, 8: 1355-83.

## **8. Apéndice**