

**EVALUACIÓN DE LA GENOTOXICIDAD DE UNA SERIE DE QUINOLINAS  
SUSTITUIDAS EN EL ENSAYO SOS CHROMOTEST**

**LEIDY TATIANA DÍAZ DURÁN**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER  
FACULTAD DE CIENCIAS  
ESCUELA DE BIOLOGÍA  
BUCARAMANGA  
2012**

**EVALUACIÓN DE LA GENOTOXICIDAD DE UNA SERIE DE QUINOLINAS  
SUSTITUIDAS EN EL ENSAYO SOS CHROMOTEST**

**LEIDY TATIANA DÍAZ DURÁN**

**Trabajo de Grado presentado como requisito para optar al título de Bióloga**

**DIRECTOR:  
JORGE LUIS FUENTES LORENZO, MICROBIÓLOGO, M.Sc., Ph.D.**

**CO-DIRECTOR:  
VLADIMIR V. KOUZNETSOV, Ph.D., D.Sc.**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER  
FACULTAD DE CIENCIAS  
ESCUELA DE BIOLOGÍA  
BUCARAMANGA  
2012**

*A Dios y a mi familia, quienes me han acompañado  
estos años, a mis amigos... con los que he  
compartido momentos de alegría y tristeza... y a  
todos aquellos que le han dado un buen motivo a mi  
vida*

*“La ciencia no es más que un refinamiento  
del pensamiento cotidiano.” Einstein*

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Vicerrectoría de Investigación y Extensión por la financiación del proyecto.

Al profesor Jorge Luis Fuentes Lorenzo por permitirme hacer parte del laboratorio de Microbiología y Mutagénesis Ambiental y desarrollar allí mi proyecto de investigación.

A los integrantes del laboratorio de Microbiología y Mutagénesis Ambiental quienes fueron de ayuda durante el desarrollo del proyecto.

Al profesor Vladimir Kouznetsov y al laboratorio de Química Orgánica y Biomolecular (LQOBio) por hacernos parte de su investigación y facilitarnos los compuestos a evaluar.

## TABLA DE CONTENIDO

	<b>pág.</b>
INTRODUCCIÓN	16
1. MARCO TEÓRICO	20
1.1 COMPUESTOS QUINOLÍNICOS	20
1.2 MECANISMO DE ACCIÓN MUTAGÉNICA DE LAS QUINOLINAS	22
1.3 RELACIÓN ESTRUCTURA-ACTIVIDAD	24
1.4 MUTÁGENOS DE REFERENCIA	26
1.4.1 Benzo [a] pireno	26
1.4.2 Aflatoxina B1	27
1.4.3 4-nitroquinolina-1-óxido.	27
1.5 SOS CHROMOTEST	28
2. METODOLOGÍA	32
2.1 MEDIOS Y COMPUESTOS QUÍMICOS	32

2.2	COMPUESTOS EVALUADOS EN EL ESTUDIO	32
2.3	CEPA DE ENSAYO Y CONDICIONES DE CULTIVO	36
2.4	ENSAYO DE GENOTOXICIDAD	37
2.4.1	Ensayos enzimáticos	38
2.4.2	Cálculo del Factor de Inducción SOS	39
2.4.3	Cálculo de la Potencia de Inducción SOS (SOSIP)	40
2.5	ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS	40
3.	RESULTADOS	42
3.1	INDUCCIÓN DE LA RESPUESTA SOS POR TRATAMIENTOS CON LOS MUTÁGENOS DE REFERENCIA 4-NITROQUINOLIN-1-ÓXIDO Y BENZO[A]PIRENO.	42
3.2	GENOTOXICIDAD DE DERIVADOS DE LA QUINOLINA	44
3.3	GENOTOXICIDAD DE DERIVADOS DE LA 4-METILQUINOLINA	50
3.4	GENOTOXICIDAD DE QUINOLINAS BASADAS EN LA ESTRUCTURA DEL 4-NITROQUINOLIN-1-ÓXIDO	57
4.	DISCUSIÓN	64
5.	CONCLUSIONES	69
6.	RECOMENDACIONES	71

BIBLIOGRAFÍA

72

ANEXOS

91

## LISTA DE FIGURAS

	<b>pág.</b>
Figura 1. Rutas metabólicas de detoxificación de la quinolina en mamíferos.	24
Figura 2. Rutas metabólicas de activación del benzo[a]pireno.	27
Figura 3. Rutas metabólicas de activación de la aflatoxina B1.	28
Figura 4. Ruta de activación del 4-nitroquinolin-1-óxido.	29
Figura 5. Inducción de la respuesta SOS en <i>Escherichia coli</i> (cepa PQ37).	31
Figura 6. Primer grupo de quinolinas evaluadas.	33
Figura 7. Segundo grupo de quinolinas evaluadas.	34
Figura 8. Tercer grupo de quinolinas evaluadas.	35
Figura 9. Cinética de inducción del gen <i>sulA</i> en <i>E. coli</i> PQ37 por tratamiento con benzo[a]pireno.	43
Figura 10. Cinética de inducción del gen <i>sulA</i> en <i>E. coli</i> PQ37 por tratamiento con la 4-nitroquinolin-1-óxido.	43

Figura 11. Potencia de inducción de la respuesta SOS en 4-metilquinolina y mutágenos de referencia. 56

Figura 12. Potencia de inducción de la respuesta SOS en quinolinas basadas en la estructura del 4-nitroquinolin-1-óxido. 63

## LISTA DE TABLAS

	<b>pág.</b>
Tabla 1. Derivados de quinolina de origen natural.	20
Tabla 2. Derivados de quinolina de origen sintético con potencial farmacéutico.	21
Tabla 3. Valores promedios del Factor de Inducción SOS (FI) obtenidos para derivados de la quinolina usando el SOS Chromotest.	44
Tabla 4. Valores promedios de Factor de Inducción SOS (FI) obtenidos para derivados de la 4-metilquinolina usando el SOS Chromotest.	50
Tabla 5. Valores promedios de Factor de Inducción SOS (FI) obtenidos para quinolinas basadas en la estructura del 4-nitroquinolin-1-óxido usando el SOS Chromotest.	58

## LISTA DE ANEXOS

	<b>pág.</b>
Anexo A. Composición y forma de preparación de la mezcla de activación metabólica, soluciones buffer y soluciones sustrato para los ensayos enzimáticos (Modificado del protocolo propuesto por Quillardet y Hofnung,1985).	91
Anexo B. Cinética de inducción del gen <i>sulA</i> en <i>E. coli</i> PQ37 para derivados de la quinolina.	94
Anexo C. Cinética de inducción del gen <i>sulA</i> en <i>E. coli</i> PQ37 para derivados de la 4-metilquinolina.	97
Anexo D. Cinética de inducción del gen <i>sulA</i> en <i>E. coli</i> PQ37 para quinolinas basadas en la estructura del 4-nitroquinolin-1-óxido.	100

## RESUMEN

**TITULO: EVALUACIÓN DE LA GENOTOXICIDAD DE UNA SERIE DE QUINOLINAS SUSTITUIDAS EN EL ENSAYO SOS CHROMOTEST\*.**

**AUTOR: LEIDY TATIANA DÍAZ DURÁN\*\***

**PALABRAS CLAVE:** Genotoxicidad, quinolinas, estructura-actividad, SOS chromotest.

Las quinolinas son compuestos nitrogenados con alto potencial terapéutico, principalmente en el tratamiento de enfermedades parasitarias y microbianas. Sin embargo, muchos de estos compuestos han mostrado un claro efecto carcinogénico asociado con su potencia mutagénica en modelos de mamíferos; limitando su potencial uso como fármacos. Estudios sobre la relación estructura-genotoxicidad de las quinolinas sustituidas han mostrado, que la incorporación de ciertos átomos en su estructura química modifican su clastogenicidad, mutagenicidad y carcinogenicidad. En el presente estudio evaluó la genotoxicidad de una serie de quinolinas y la influencia de los sustituyentes (grupos y/o átomos) del anillo quinolínico; buscando la relación entre la estructura y la actividad biológica. Para ello se evaluaron una serie de derivados de quinolina, 4-metilquinolina y análogos del 4-nitroquinolin-1-óxido, mediante el ensayo SOS Chromotest en presencia de activación metabólica. Las quinolinas cuyo mecanismo de genotoxicidad es mediado por la formación de una enamina epóxido son pobres inductores de la respuesta SOS en *E. coli*. Solo la 4-metil-quinolina, resultó levemente mutagénica. Las quinolinas cuyo mecanismo de genotoxicidad es mediado por la reducción del grupo nitro (NO<sub>2</sub>) en la posición C-4 (4-nitroquinolin-1-óxidos) fueron fuertes inductores de la respuesta SOS en *E. coli*; por tanto, son considerados genotóxicas en el modelo experimental usado. Asimismo, la incorporación de grupos sustituyentes en la posición C-2 del anillo quinolínico de todos los tipos de quinolinas estudiados, afectó la potencia genotóxica del compuesto en cuestión; siendo particularmente evidente en las 4-metilquinolinas y los 4-nitroquinolin-1-óxidos. Igualmente, la incorporación de grupos sustituyentes en el anillo bencénico de 2-fenilquinolinas, de 2-(3,4-metilendioxfenil)quinolinas y de 4-metil-2-(piridil)quinolinas, no modificaron significativamente su genotoxicidad. Finalmente, el ensayo SOS Chromotest resultó sensible para el estudio de relación estructura-genotoxicidad, especialmente, para compuestos cuyo mecanismo de genotoxicidad es mediado por la reducción del grupo nitro (NO<sub>2</sub>) en la posición C-4 de la quinolina.

\*Proyecto de grado

\*\* Facultad de Ciencias, Escuela de Biología, Director: Jorge Luis Fuentes Lorenzo (M.Sc, Ph.D.).Codirector: Vladimir V. Kouznetsov (Ph.D.,D.Sc).

## ABSTRACT

**TITLE: GENOTOXICITY EVALUATION OF A SERIE OF SUBSTITUTED QUINOLINES IN THE SOS CHROMOTEST\*.**

**AUTHOR: LEIDY TATIANA DÍAZ DURÁN\*\***

**KEYWORDS:** Genotoxicity, quinolines, structure-activity relationship, SOS chromotest.

Quinolines are nitrogen compounds with wide therapeutic potential mainly in the treatment of parasitic and microbial diseases. However, many of these compounds have displayed a clear carcinogenic effect associated with mutagenic potency in mammalian models, limiting their potential use as drugs. The structure-genotoxicity studies of the quinolines have shown that the incorporation of certain atoms on their chemical structure modify their clastogenicity, mutagenicity and carcinogenicity. The present study tested the genotoxicity of a series of quinolines and the influence of substituents (groups and / or atoms) quinoline skeleton to investigate molecular structure-biological activity relationships. We tested a series of quinoline and 4-methylquinoline derivatives, 4-nitroquinolin-1-oxide analogs for genotoxicity in the SOS chromotest in the presence of metabolic activation system. Quinolines whose genotoxicity mechanism is by the formation of an enamine epoxide are weak inducers of the SOS response in *E. coli*. Only 4-methyl-quinoline, was slightly mutagenic. Quinolines whose genotoxicity mechanism is by the reduction of the nitro group (NO<sub>2</sub>) in 4-position (4-nitroquinoline-1-oxides) were strong inducers of the SOS response in *E. coli*, therefore, they are genotoxic in the experimental model. Likewise, substitutions at 2-position of quinoline skeleton of all studied quinolines affected the genotoxic potency compound, particularly evident in 4-metilquinolines and 4-nitroquinoline-1-oxides. Moreover, substitutions on the benzene moiety of 2-phenylquinolines, 2 - (3,4-methylenedioxyphenyl) quinolines and 4-methyl-2-(pyridinyl) quinolines, did not significantly modify its genotoxicity. Finally, the SOS Chromotest was sensitive for the study of structure-genotoxicity relationships, especially compounds whose genotoxicity mechanism is by the reduction of the nitro group (NO<sub>2</sub>) in 4-position of the quinoline.

\* Basic Science thesis.

\*\* Faculty of Science, Biology School, Director: Jorge Luis Fuentes Lorenzo (M.Sc, Ph.D.).Codirector: Vladimir V. Kouznetsov (Ph.D.,D.Sc).

## INTRODUCCIÓN

Las quinolinas y sus análogos estructurales, son moléculas planas aromáticas ampliamente distribuidas en la naturaleza (Michael, 1999) que muestran potencial terapéutico en el tratamiento de enfermedades de origen microbiano (Urbina *et al.*, 2000; Buller *et al.*, 2002; Hoemann *et al.*, 2002; Jacquemond-Collet *et al.*, 2002; Vargas *et al.*, 2003; Nallan *et al.*, 2005; Egan, 2006; Gómez-Barrio *et al.*, 2006; Gholap *et al.*, 2007; Nandhakumar *et al.*, 2007; Meléndez-Gómez *et al.*, 2008), como agentes antitumorales (Rodríguez-Loaiza *et al.*, 2004; Khan, 2007; Couch *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2008; Loza-Mejía *et al.*, 2008; Ferrer *et al.*, 2009) y como neuroprotectores (Wright *et al.*, 1996; Di Fabio *et al.*, 2003).

A pesar del potencial terapéutico de las quinolinas, su utilización como fármacos se ve limitado dado que varios de estos compuestos son carcinogénicos en hígado y colon de modelos animales (Hirao *et al.*, 1976; Futakuchi *et al.*, 1996; Saeki *et al.*, 1997a); efecto que ha sido relacionado con su potencia mutagénica en el correspondiente órgano (Suzuki *et al.* 1998, 2000). Por tanto, el desarrollo de cualquier agente terapéutico con base en quinolinas supone un riguroso examen de su genotoxicidad y carcinogenicidad.

Las quinolinas pueden ejercer su efecto genotóxico por diferentes mecanismos. La genotoxicidad de la misma quinolina es mediada por enzimas hepáticas de la familia Citocromo P450 que la transforma en un metabolito altamente reactivo con el ADN, el 1,4-dihidro-4-hidroxi-2,3-epóxido-quinolina (Tada *et al.*, 1982; Saeki *et al.*, 1993, Hirano *et al.*, 2002). Este metabolito produce aductos de guanina (G) y citosina (C) que conducen a errores de apareamiento entre bases; generando así transversiones del tipo G→T o G→C (Suzuki *et al.*, 1998, 2000) que inician

diferentes tipos de carcinomas hepáticos en mamíferos (Hirao *et al.*, 1976; Futakuchi *et al.*, 1996; Saeki *et al.*, 1997a). Similar mecanismo de genotoxicidad, ha sido reportado para la 4-metilquinolina y para algunos derivados halogenados; tanto de quinolina como de 4-metilquinolina (Takahashi *et al.*, 1988; Saeki *et al.*, 1996).

Por otra parte, la genotoxicidad del 4-nitroquinolin-1-óxido (4-NQO, de sus siglas en inglés), un potente carcinógeno en mamíferos (Bailleul *et al.*, 1989), depende de la reducción enzimática (actividad nitroreductasa) del grupo nitro (NO<sub>2</sub>) en la posición C-4 de la parte "piridínica" del anillo de quinolina (Okabayashi y Yoshimoto, 1962). Se conoce, que la reducción enzimática del grupo NO<sub>2</sub> resulta en la formación de 4-N-hidroxi-aminoquinolin-1-óxido (4HAQO), la cual a su vez es modificada enzimáticamente a seril-4-N-hidroxi-aminoquinolin-1-óxido (seril-4HAQO); un compuesto altamente reactivo con el ADN que forma aductos de adenina y guanina responsables de su genotoxicidad (Araki *et al.*, 1970; Tada y Tada, 1975; Galiégue-Zouitina *et al.*, 1985, 1986; Kohda *et al.*, 1991). Adicionalmente, la 4-NQO forma 8-hidroxidesoxiguaninas (8OHdG) en el ADN a través de un mecanismo que involucra especies reactivas del oxígeno (Blaglow *et al.*, 1977; Arima *et al.*, 2006).

Diferentes estudios sobre la relación estructura-genotoxicidad de las quinolinas sustituidas han mostrado, que la incorporación de ciertos átomos en su estructura química modifican su clastogenicidad, mutagenicidad y carcinogenicidad. Así, la incorporación de un átomo de fluor en las posiciones C-5 y C-7 del anillo bencénico de la quinolina incrementa significativamente su actividad genotóxica; mientras que la incorporación del mismo átomo en la posición C-3 de la parte piridínica de la quinolina, produce la pérdida de la genotoxicidad en diferentes modelos experimentales (LaVoie *et al.*, 1991, Saeki *et al.*, 1997a, Miyata *et al.*,

1998, Kato *et al.*, 1999, Suzuki *et al.*, 2007). Se ha demostrado además, que la incorporación de un átomo de cloro o fluor en las posiciones C-2 y C-3 del anillo piridínico de la quinolina, respectivamente, produce pérdida de la carcinogenicidad de las moléculas (Hirao *et al.*, 1976, Saeki *et al.*, 1997a,b). Otros derivados de la quinolina (4-metilquinolina) o estructuralmente relacionados con éstas (aza-crisenos), también han mostrado pérdida de la mutagenicidad cuando se incorpora un átomo de fluor o cloro en las posiciones C-2 o C-3 de la parte piridínica del núcleo quinolínico o en posición equivalente (Saeki *et al.*, 1996, Kato *et al.*, 2000, Hakura *et al.*, 2007).

Sin embargo, no hay reportes de como afecta la mutagenicidad de las quinolinas, si se incorporan átomos de halógenos o grupos alquílicos (metilo, isopropilo) en las posiciones C-6 y C-8 del anillo de quinolina o grupos aromáticos con carácter de aceptores de electrones (fenilo, piridinilo) y grupos “no-halógenos”, aromáticos con carácter de donadores de electrones (3,4-metilendioxfenilo) en la posición C-2.

El Laboratorio de Química Orgánica y Biomolecular (LQOBio) de la Escuela de Química de la Universidad Industrial de Santander, ha desarrollado por varios años nuevos compuestos quinolínicos con potente actividad antimicótica; entre los que destacan las 2-fenilquinolinas, 2-(3,4-metilendioxfenil)quinolinas (análogos del alcaloide dubamina), 4-metil-2-piridilquinolinas, entre otras (Vargas *et al.*, 2003; Meléndez-Gómez *et al.*, 2008). Dado que poco se conoce sobre la genotoxicidad de estos compuestos, el presente trabajo tiene como objetivos los siguientes: *i)* evaluar la genotoxicidad de varias quinolinas sustituidas sintéticas mediante el ensayo SOS chromotest, *ii)* evaluar si la incorporación de los diferentes sustituyentes (fenilo, 3,4-metilendioxfenilo, piridinilo y 4-nitrofenil, metilo) en la posición C-2 de las (4-metil)quinolinas y del 4-NQO, modifican su

genotoxicidad y, *iii*) evaluar si la incorporación de átomos de halogenos o grupos alquílicos, sustituyentes en el anillo bencénico de 2-fenilquinolinas, de 2-(3,4-metilendioxfenil)quinolinas y de la 4-metil-2-piridilquinolinas, modifican su genotoxicidad.

# 1. MARCO TEÓRICO

## 1.1 COMPUESTOS QUINOLÍNICOS

La quinolina y sus derivados son compuestos heterocíclicos aromáticos formados por un anillo bencénico unido a un anillo piridínico, son generalmente de bajo peso molecular y son solubles en solventes orgánicos (Kouznetsov *et al.*, 2007). Estos compuestos pueden encontrarse en la naturaleza formando parte de los metabolitos de plantas (Michael, 1999). En la Tabla 1, se muestra algunos compuestos quinolínicos de origen natural con actividad biológica importante.

Tabla 1. Derivados de quinolina de origen natural

Especie	Compuesto quinolinico	Descripción	Fuente
<i>Galipea officinalis</i>	Alcaloides de tetrahydroquinolinas	Actividad antiparasitaria contra <i>Plasmodium falciparum</i> .	Jacquemond-Collet <i>et al.</i> , 2002
<i>Ephedra transitoria</i>	Transtorina	Alcaloide que inhibe el crecimiento de <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y <i>Staphylococcus aureus</i>	Al-Khalil <i>et al.</i> , 1998
<i>Helieta apiculata</i>	Alcaloides de furoquinolina	Inhibe el citocromo P-450	Goloubkova <i>et al.</i> , 1998
<i>Pseudonocardia</i> sp.	Quinolinas 4-sustituidas	Eficaces contra <i>Helicobacter pylori</i>	Dekker <i>et al.</i> , 1998
<i>Micromonospora</i>	(2)-Tiocoralina	Eficaz contra bacterias Gram-positivas, con efecto citotóxico contra algunas líneas celulares tumorogénicas e inhibidor de la síntesis de ARN.	Romero <i>et al.</i> , 1997
<i>Micromonospora carbonacea</i> var. <i>africana</i>	(2)-Sch 40832	A partir de fermentación, potente antibiótico contra bacterias Gram-positivas.	Puar <i>et al.</i> , 1998
<i>Oreophoetes peruana</i>	Quinolina	Los insectos al parecer, la usan como defensa contra hormigas, arañas, cucarachas y ranas.	Eisner <i>et al.</i> , 1997

Debido a la amplia actividad biológica de estos compuestos, el esqueleto quinolínico se usa frecuentemente para diseñar compuestos sintéticos con potencial farmacológico. El desarrollo de nuevas rutas de síntesis y el mejoramiento de las propiedades biológicas, han sido de especial interés (Kouznetsov *et al.*, 2005; Vargas *et al.*, 2003; Nallan *et al.*, 2005; Meléndez-Gómez *et al.*, 2008). En la Tabla 2 se muestra algunos compuestos quinolínicos sintetizados de interés farmacológico.

Tabla 2. Derivados de quinolina de origen sintético con potencial farmacéutico

Compuesto quinolínico	Descripción	Fuente
4-Aril-4-N-arilamina-1-butenos	Inhibidores $\beta(1-3)$ glucano-sintetasa y quitina-sintetasa, (enzimas importantes en la síntesis de la pared celular fúngica)	Urbina <i>et al.</i> 2000
2-(1H-Indol-3-il)tetrahydroquinolinas	Antibacterial con potente actividad contra <i>Staphylococcus aureus</i> resistente a metilicina	Hoemann <i>et al.</i> 2002
Tetrahydroquinolinas sustituidas	Agente neuroprotector (Antagonista de glicina del receptor de NMDA)	Di Fabio <i>et al.</i> 2003
4-N-Arilamino-4- $\beta$ -piridil-1-butenos	Inhibidores $\beta(1-3)$ glucano-sintetasa y quitina-sintetasa, (enzimas importantes en la síntesis de la pared celular fúngica)	Vargas <i>et al.</i> 2003
Tetrahydroquinolinas	Inhibidores de la proteína Farnesiltransferasa ( <i>Plasmodium falciparum</i> )	Nallan <i>et al.</i> 2005
N-(4-Bromofenil)-N-(2-furilmetil)amina y N-(4-clorofenil)-N-(2-furilmetil)amina	Antifúngicos (Dermatofitos)	Suivre <i>et al.</i> 2006
2-Amino-5-oxo-4-fenil-5,6,7,8-tetrahydroquinolina-3-carbonitrilos	Antifúngicos ( <i>Mucor sp.</i> , <i>Fusarium oxysporum</i> , <i>Candida albicans</i> )	Gholap <i>et al.</i> 2007
4-Metil-8-isopropil-2-(3-piridinil) quinolina	Antiparasitario ( <i>Trypanosoma cruzi</i> y <i>Leishmania chagasi</i> )	Kouznetsov <i>et al.</i> 2007
4-Cloro-3-formil-2-(2-hidroxi-etene-1-il)quinolinas	Antifúngicos y antibacteriales	Nandhakumar <i>et al.</i> 2007
2-Hetaril quinolinas	Antifúngicos ( <i>Cryptococcus</i> , <i>Candida albicans</i> , <i>Candida tropicalis</i> , <i>Trichophyton rubrum</i> , <i>Trichophyton mentagrophytes</i> )	Meléndez-Gómez <i>et al.</i> 2008
Derivados 8-hidroxi-2-metilquinolina-7-ácido carboxílico, derivados de 8-hidroxi-2-metil-5-nitroquinolina-7-ácido carboxílico y 5-hidroxi-2-metilquinolina-6-carboxamidas	Actividad antialgal e inhibidores de la cadena de transporte de electrones en la fotosíntesis.	Musiol <i>et al.</i> 2008
1H-Pirrol[3,2-g]quinolina-4,9-dionas y 4,9-dioxo-4,9-dihidro-1H-benzo[f]indoles	Antifúngicos ( <i>Candida albicans</i> , <i>Candida tropicalis</i> , <i>Candida krusei</i> , <i>Cryptococcus neoformans</i> , <i>Aspergillus niger</i> )	Ryu <i>et al.</i> 2009

Diversos estudios han logrado determinar que las quinolinas forman parte de las complejas mezclas contaminantes de nuestro ambiente. Por ejemplo, algunas quinolinas están presentes en el humo de cigarrillo y son asociadas con las enfermedades del tabaco (Borgerding *et al.*, 1997; Smith *et al.*, 1999; Saha *et al.*, 2010). Otras forman parte del alquitrán y de aceites minerales de uso industrial que finalmente terminan contaminando el suelo, el agua y el aire (Jianlong *et al.*, 2000; Neuwoehner *et al.*, 2009). Actualmente, la quinolina, y algunos de sus derivados, forman parte de la lista de los contaminantes peligrosos de la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (EPA, de sus siglas en inglés) (EPA, 2001).

## **1.2 MECANISMO DE ACCIÓN MUTAGÉNICA DE LAS QUINOLINAS**

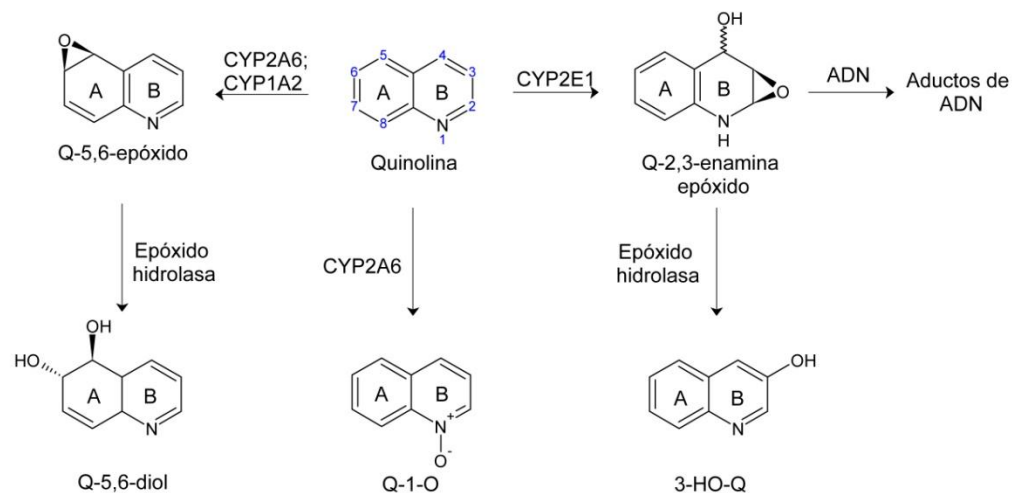
A pesar del amplio potencial farmacológico de las quinolinas, su uso se ve limitado dado que la quinolina, la 4-metilquinolina y otras quinolinas metiladas y/o halogenadas, generan tumores en hígado de rata, ratón y hamster (Hirao *et al.*, 1976; Futakuchi *et al.*, 1996; Saeki *et al.*, 1997a; Suzuki *et al.*, 1998; Hakura *et al.*, 2007; Suzuki *et al.*, 2007) y son mutagénicas en modelos bacterianos (Takahashi *et al.*, 1988; LaVoie *et al.*, 1991; Saeki *et al.*, 1997b, 2000; Kato *et al.*, 1999, 2000). Por ello, el uso de cualquier agente terapéutico de tipo quinolínico supone un previo y riguroso examen de su genotoxicidad y carcinogenicidad.

Las enzimas de la familia Citocromo P450 Oxidasa participan en el metabolismo oxidativo de fase I de bio-transformación de la quinolina que convierten ésta en metabolitos de baja toxicidad (Tada *et al.*, 1982; Saeki *et al.*, 1993; Reigh *et al.*, 1996). En humanos, la detoxificación de la quinolina involucra a las especies enzimáticas CYP2A6 y CYP1A2 de la familia de Citocromo P450 Oxigenasa, las

cuales oxidan la quinolina por su anillo bencénico (**A**) para formar quinolina-5,6-epóxido (Q-5,6-epóxido). Este metabolito, es eficientemente transformado a quinolina-5,6-diol (Q-5,6-diol) por acción de una enzima con actividad epóxido hidrolasa. La Q-5,6-diol es el producto mayoritario del proceso detoxificación hepática de la quinolina en diferentes modelos de mamíferos, por lo que se considera ésta ruta como la vía principal de detoxificación. Asimismo, las CYP2A6 transforman la quinolina en el quinolin-1-óxido (Q-1-O). Este metabolito es también producido al incubar la quinolina con enzimas hepáticas de ratas inducidas con fenobarbital (Reigh *et al.*, 1996) (Ver Figura 1). Además, éstas enzimas pueden llegar a reconocer la posición C-3 de la quinolina, produciendo 3-hidroxiquinolina en baja cantidad como vía alterna (Hirano *et al.*, 2002).

Por otra parte, la especie enzimática CYP2E1, y posiblemente otras actualmente desconocidas, oxidan el anillo piridínico (**B**) del hidrato de quinolina (enamina) produciendo otro metabolito quinolínico, el 1,4-dihidro-4-hidroxi-2,3-epóxido-quinolina (Q-2,3-enamina epóxido), altamente reactivo con el ADN (Tada *et al.*, 1982; Saeki *et al.*, 1993, Hirano *et al.*, 2002). Este metabolito intermediario eventualmente es convertido por actividad epóxido hidrolasa en 3-hidroxiquinolina (3-HO-Q) completando la ruta de detoxificación. Sin embargo, la Q-2,3-enamina epóxido puede acumularse en pequeñas proporciones, posiblemente porque los mecanismos de detoxificación en ocasiones fallan (Saeki *et al.*, 1997b) (Ver Figura 1). Ésta vía es considerada como una ruta menor de activación mutagénica del compuesto en diferentes modelos de mamíferos (Hirao *et al.*, 1976; Futakuchi *et al.*, 1996; Saeki *et al.*, 1997a; Suzuki *et al.*, 1998; Hakura *et al.*, 2007; Suzuki *et al.*, 2007).

Figura 1. Rutas metabólicas de detoxificación de la quinolina en mamíferos.



Algunos de estos mecanismos de detoxificación y activación metabólica han sido además descritos para la 4-metilquinolina. Ésta ha mostrado ser más mutagénica que la quinolina, probablemente porque el grupo metilo (grupo voluminoso y donador de electrones leve) interfiere en la detoxificación del 5,6-epóxido formado (Saeki *et al.*, 1996). Se ha sugerido, que el grupo metilo en la posición C-4 podría generar un impedimento estérico que retardaría la apertura del anillo epóxido de la Q-2,3-enamina epóxido; permitiendo así su reacción con el ADN (Saeki *et al.*, 1996).

### 1.3 RELACIÓN ESTRUCTURA-ACTIVIDAD

La incorporación de ciertos átomos y grupos en la estructura química de la quinolina es determinante para su clastogenicidad, mutagenicidad y carcinogenicidad. Así, estudios en diferentes modelos biológicos han mostrado

que la incorporación de un átomo flúor en las posiciones C-2 y C-3 del anillo piridínico de la quinolina, conducen a la pérdida de mutagenicidad de la quinolina; ya que éstas posiciones son esenciales para la formación del metabolito genotóxico de la quinolina (Q-2,3-enamina epóxido) (Takahashi *et al.*, 1988; LaVoie *et al.*, 1991; Saeki *et al.*, 1993; Saeki *et al.*, 1997a; Saeki *et al.*, 1997b; Miyata *et al.*, 1998; Kato *et al.*, 1999; Suzuki *et al.*, 2007). Similar efecto se ha comprobado para el caso de su carcinogenicidad (Hirao *et al.*, 1976). En contraste, las 5- y 7-fluoroquinolinas son más mutagénicas que la quinolina, posiblemente porque esto evita la formación metabólica del Q-5-6-diol (Takahashi *et al.*, 1988; LaVoie *et al.*, 1991; Saeki *et al.*, 1997ab; Miyata *et al.*, 1998; Kato *et al.*, 1999; Suzuki *et al.*, 2007). De la misma manera, las 6- y 8-fluoroquinolinas son mutagénicas y clastogénicas (Takahashi *et al.*, 1988; LaVoie *et al.*, 1991; Suzuki *et al.*, 2007).

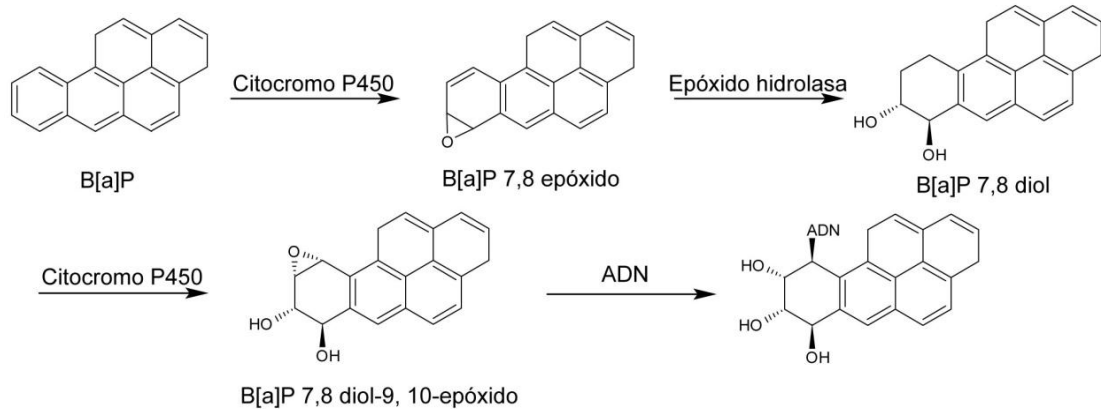
La incorporación del grupo metilo en las posiciones C-2 y C-3 de la parte piridínica de la quinolina lleva a la pérdida de la actividad mutagénica (Takahashi *et al.*, 1988; LaVoie *et al.*, 1991). En contraste, su incorporación en la posición C-4 aumenta la potencia mutagénica, mientras que en las posiciones C-6 y C-7 la disminuyen levemente (Takahashi *et al.*, 1988). La 4-metilquinolina u otros compuestos estructuralmente relacionados con estos (aza-crisenos), también han mostrado pérdida de la mutagenicidad cuando se incorpora un átomo de flúor o cloro en los carbonos C-2 o C-3 de la parte piridínica del núcleo de quinolina o en posición equivalente (Saeki *et al.*, 1996; Kato *et al.*, 2000; Hakura *et al.*, 2007).

## 1.4 MUTÁGENOS DE REFERENCIA

**1.4.1 Benzo[a]pireno.** Es un hidrocarburo policíclico aromático presente en el humo de cigarrillo (Borgending *et al.*, 1997; Smith *et al.*, 1999; Hecht, 1999; Counts *et al.*, 2005) y en diferentes contaminantes ambientales.

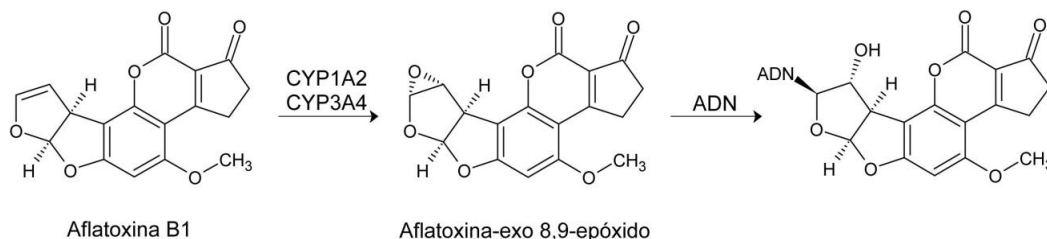
El benzo[a]pireno (B[a]P) es un potente carcinógeno en ratón (Levin *et al.*, 1976; Buening *et al.*, 1978). Su bioactivación inicia con la formación de un epóxido en las posiciones C-7 y C-8 del anillo policíclico (B[a]P 7,8-epóxido), mediada por enzimas de la familia Citocromo P450 Oxidasa (Conney *et al.*, 1957; Jiang *et al.*, 2007; Uppstad *et al.*, 2010). Este metabolito es hidrolizado a un dihidroxiderivado por acción de una Epóxido Hidrolasa obteniéndose el 7,8-dihidrodiol del benzo[a]pireno (B[a]P 7,8-dihidrodiol) (Jiang *et al.*, 2007). Este último, es sustrato de CYP mediadoras de epoxidación resultando en el 7,8-diol-9,10-epóxido, el cual es altamente reactivo con el ADN (Jiang *et al.*, 2007; Uppstad *et al.*, 2010) (Ver Figura 2). Este metabolito puede formar aductos de ADN, sitios apurínicos y rompimiento de cadenas, eventos relacionados con la carcinogénesis del compuesto (Hanelt *et al.*, 1997).

Figura 2. Rutas metabólicas de activación del benzo[a]pireno.



**1.4.2 Aflatoxina B1.** Es un metabolito secundario producido naturalmente por especies de *Aspergillus*. Se encuentra en productos alimenticios, principalmente en cereales (Wild y Turner, 2002), y es responsable de numerosas enfermedades y muertes de animales de granja (Kensler *et al.*, 2011). El compuesto es clasificado como un carcinógeno grupo 1 según la Agencia Internacional para la investigación del cáncer (IARC); por lo tanto, la exposición al compuesto es de alto riesgo para la salud humana. Diversos estudios sustentan la carcinogenicidad de la Aflatoxina B1 (AFB1) en roedores, primates y peces (Rastogi *et al.*, 2005; Kensler *et al.*, 2011); así como, su mutagenicidad en modelos bacterianos (Stark *et al.*, 1979). La bioactivación de la AFB1 es mediada por enzimas de la familia Citocromo P450 Oxidasa. La acción de las enzimas CYP1A2 y CYP3A4, conducen a la formación de aflatoxina-endo 8,9-epóxido y aflatoxina-exo 8,9-epóxido (Gallagher *et al.*, 1994), compuesto altamente reactivo con el ADN que produce mayormente el aducto 2,3-dihidro-2(*N*<sup>7</sup>-guanil-3-hidroxiaflatoxina B1 (Essigmann *et al.*, 1977; Wild y Turner, 2002) (Ver Figura 3).

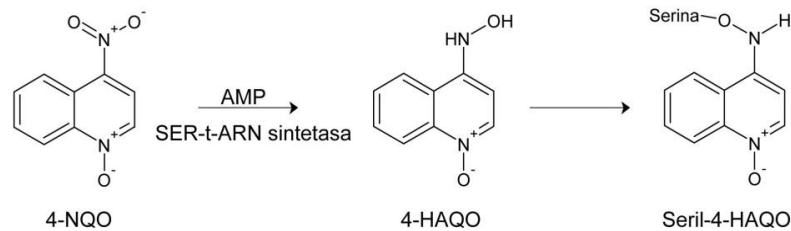
Figura 3. Rutas metabólicas de activación de la aflatoxina B1.



**1.4.3 4-nitroquinolin-1-óxido.** Es un potente carcinógeno en piel, pulmón, estómago y páncreas de ratón (Bailleul *et al.*, 1989; Papp-Szabó *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2010). El 4-NQO sufre una reacción enzimática mediada por la DT-diaforasa, la cual implica la reducción enzimática (DT-diaforasa) del grupo nitro (Tada 1975; Demeunynck *et al.*, 1989; Arima *et al.*, 2006). La reducción de cuatro electrones produce 4-N-hidroxilaminoquinolin-1-óxido (4HAQO), el cual se cree es el metabolito genotóxico (Tada, 1975; Blaglow *et al.*, 1977). El 4HAQO ha mostrado ser activado por una reacción con la Seril-tRNA-sintetasa, en la cual, el 4HAQO es acilado por un complejo enzimático AMP-seril, produciendo seril-4HAQO (Ver Figura 4). Este último introduce anillos de la quinolina dentro del ADN formando monoadductos de quinolina estables como: la N-(desoxiguanosin-8-il)-4HAQO (dGuo-C8-AQO) (Bailleul *et al.*, 1981), 3-(desoxiguanosin-N<sup>2</sup>-il)-4-aminoquinolina (dGuo-N2-AQO), la 3-(desoadenosin-N<sup>6</sup>-il)-4-aminoquinolina (dAdo-N6-AQO) (Galiègue-Zoutina *et al.*, 1986), la N<sup>4</sup>-(guanosa-7-il)-4-aminoquinolina (Kohda *et al.*, 1991) y la 8-hidroxidesoxiguanosin (Arima *et al.*, 2006). La acción del 4-NQO genera además lesiones de simple cadena en el ADN (Menichini *et al.*, 1989; Panagrahi y Walker, 1991) debido, en parte, a la formación de sitios apurínicos y apirimidínicos (Menichini *et al.*, 1989).

Su ensayo en modelos bacterianos no requiere de sistemas exógenos de activación metabólica.

Figura 4. Ruta de activación del 4-nitroquinolin-1-óxido



## 1.5 SOS CHROMOTEST

El SOS Chromotest es un ensayo de genotoxicidad que mide la inducción de la respuesta SOS en *Escherichia coli* (cepa PQ37) como resultado del daño producido en el ADN por agentes químicos y físicos (Quillardet *et al.*, 1982).

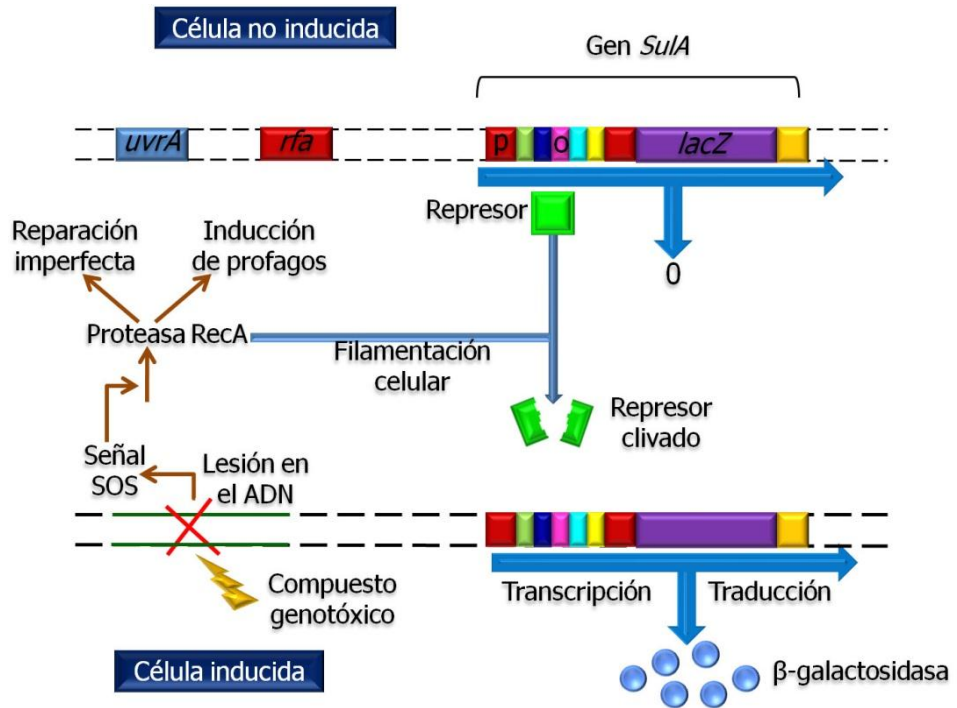
La cepa PQ37 posee una fusión transcripcional del gen *sulA* (regulado bajo la respuesta SOS) y el gen estructural de la  $\beta$ -galactosidasa ( $\beta$ -G) del operón Lactosa. El operon *Lac* es deletado del cromosoma de la cepa PQ37; por lo que la actividad  $\beta$ -G depende únicamente de la expresión del gen *sulA*. La cepa PQ37 es constitutiva para la actividad fosfatasa alcalina (FA) y posee una mutación en el gen *uvrA* que la hace deficiente en la reparación por escisión de nucleótidos, lo que aumenta su sensibilidad a ciertos agentes. Tiene además una mutación en el gen *rfa*, que la hace deficiente en lipopolisacáridos de membrana,

lo que permite una mejor difusión de algunas sustancias químicas en la célula (Ver Figura 5).

Durante el ensayo se desarrollan en paralelo mediciones de las actividades enzimáticas  $\beta$ -G y FA, siendo esta última una medida indirecta de la citotoxicidad del compuesto ensayado. La relación  $\beta$ -G/FA se denomina factor de inducción (FI) e indica el grado de inducción SOS en un compuesto de prueba.

El ensayo es sensible a una amplia gama de compuestos químicos (von der Hude *et al.*, 1988, 1990; Glatt *et al.*, 1991; Mersch-Sundermann *et al.*, 1996) y agentes físicos (Kozubek *et al.*, 1990). Se ha comprobado, que la mayoría de los mutágenos conocidos, son buenos inductores de la respuesta SOS (Otha *et al.*, 1984; von der Hude *et al.*, 1988; Glatt *et al.*, 1991; Mersch-Sundermann *et al.*, 1994). Por último, el ensayo es susceptible a ser automatizado por lo que resulta altamente eficiente para el escrutinio masivo de compuestos (Fuentes *et al.*, 2006).

Figura 5. Inducción de la respuesta SOS en *Escherichia coli* (cepa PQ37)



## **2. METODOLOGÍA**

### **2.1 MEDIOS Y COMPUESTOS QUÍMICOS**

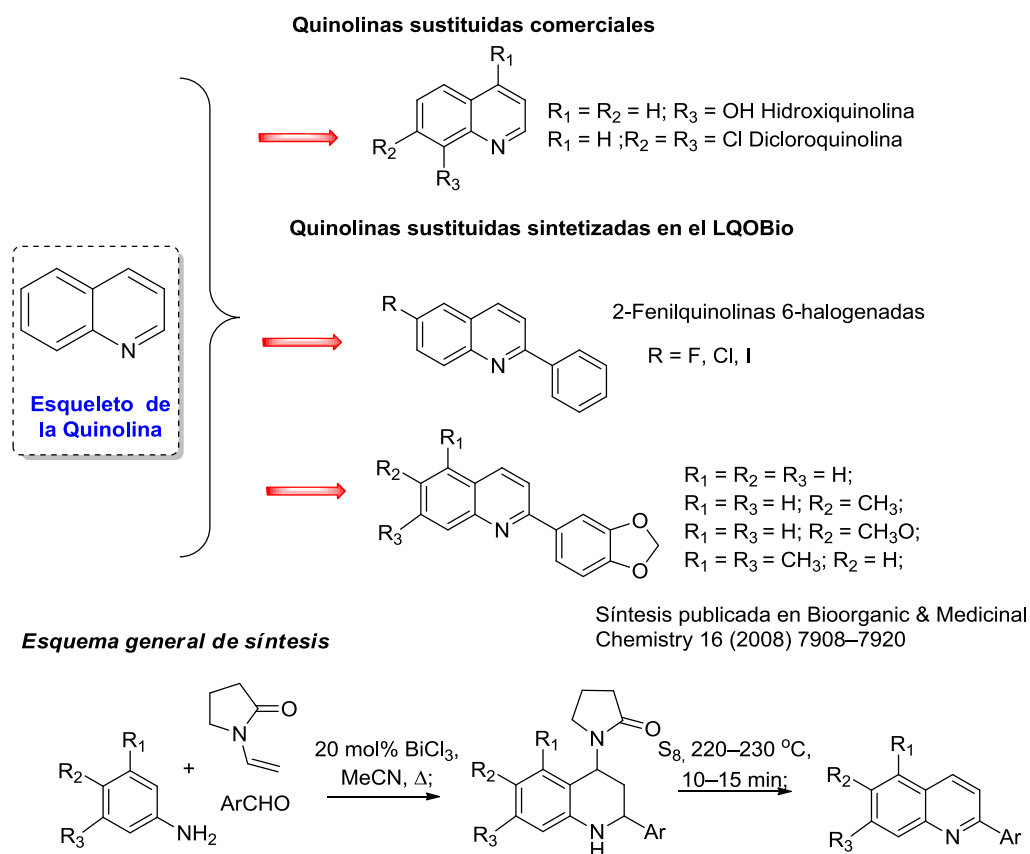
El medio Luria-Bertani (LB), los antibióticos (ampicilina y tetraciclina), los mutágenos 4-NQO, y B[a]P, y los compuestos D-Glucosa 6-fosfato y dimetilsulfoxido (CAS No. D5879-1L); se obtuvieron de la casa comercial SIGMA-ALDRICH Co. (ST. Louis, Missouri, USA). El sustrato para la enzimas  $\beta$ -galactosidasa (2-nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosido, ONPG) y la Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADP), fueron obtenidos de AMRESCO (Solon, Ohio, USA); mientras que el sustrato de la fosfatasa alcalina (4-nitrofenilfosfato), se obtuvo de CALBIOCHEM (Darmstadt, Alemania). La fracción liofilizada S9 de hígado de rata se obtuvo de la casa comercial MOLTOX (Molecular Toxicology Inc. Boone, NC USA). Los restantes compuestos químicos y solventes usados en el estudio fueron comprados a la casa comercial J.T. BAKER (Phillipsburg, NJ, USA).

### **2.2 COMPUESTOS EVALUADOS EN EL ESTUDIO.**

En total, 26 compuestos quinolínicos (comerciales y sintetizados) fueron evaluados. Las quinolinas comerciales fueron de marca de SIGMA-ALDRICH Co. (ST. Louis, Missouri, USA). Los compuestos sintéticos fueron preparados en el Laboratorio de Química Orgánica y Biomolecular de la Escuela de Química de la Universidad Industrial de Santander según los protocolos desarrollados por el propio laboratorio. Las quinolinas evaluadas se dividieron en varios grupos (series) según el criterio químico estructural.

En la primera serie de compuestos estudiados se encuentran los derivados de la quinolina: dos quinolinas comerciales (8-hidroxiquinolina, 4,7-dicloroquinolina) y siete quinolinas sintetizadas (2-arylquinolinas sustituidas). Su síntesis fue realizada según el protocolo publicado en Meléndez-Gómez *et al.* (2008) (Figura 6).

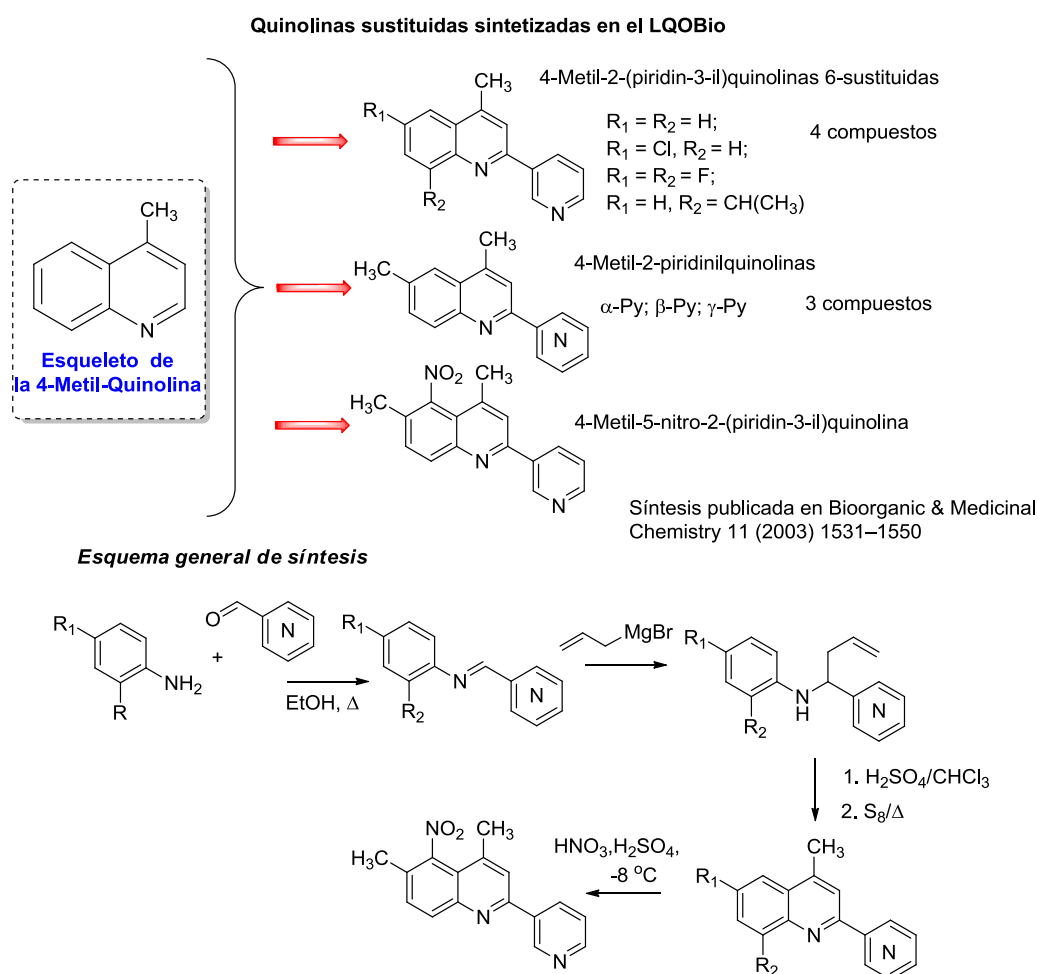
Figura 6. Primer grupo de quinolinas evaluadas



La segunda serie de quinolinas contiene los derivados de la 4-metilquinolina que poseen anillo piridínico en la posición C-2: 4-metil-2-(piridin-3-il)quinolinas sustituidas (4 compuestos), 4-metil-2-(piridinil)quinolinas (3 compuestos) y una 4-

metil-5-nitro-2-(piridin-3-il)quinolina. Su síntesis fue realizada según el protocolo publicado en Vargas *et al.* (2003) (Figura 7).

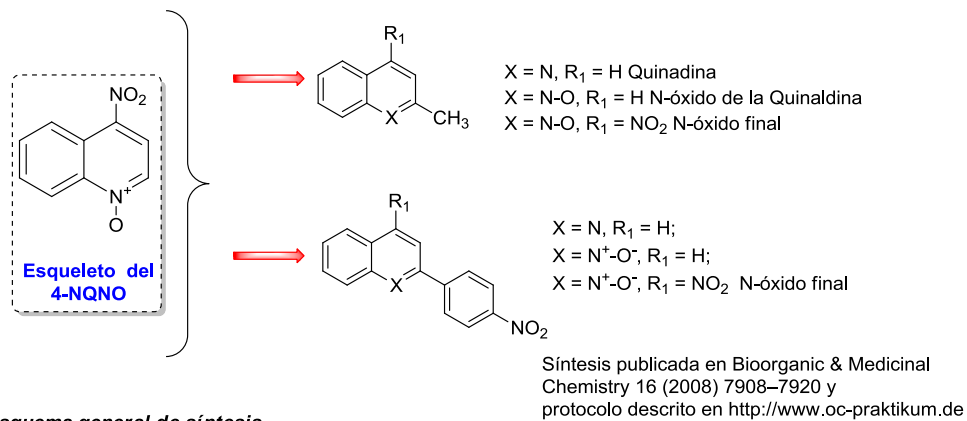
Figura 7. Segundo grupo de quinolinas evaluadas



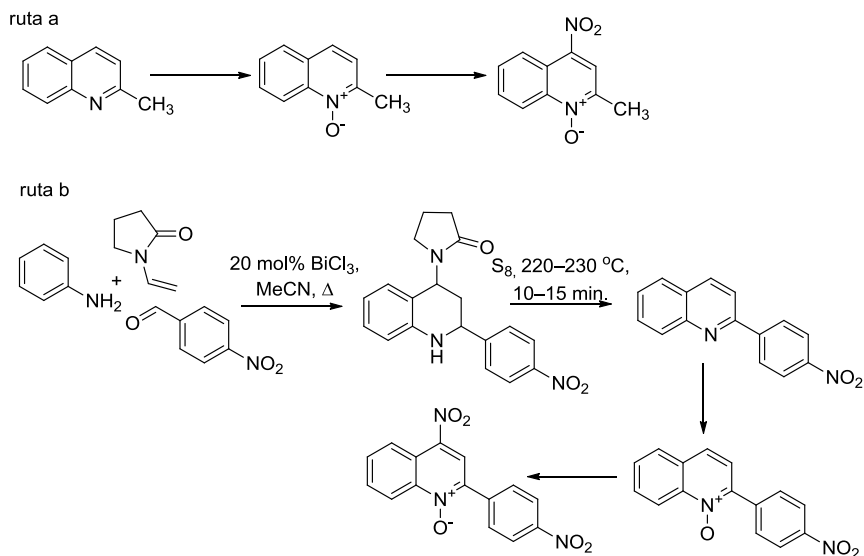
El tercer grupo de quinolinas son análogos sintéticos del agente mutagénico 4-NQO. Este grupo contiene las dos moléculas quinolín1-óxidas y sus respectivos precursores sintéticos (5 compuestos). La síntesis del 2-metil-4-nitroquinolina-1-

óxido (análogo metilado del 4-NQO) se realizó en dos pasos a partir de la comercial 2-metilquinolina según protocolos establecidos (<http://www.oc-praktikum.de>). La obtención del 4-nitro-2-(4-nitrofenil)quinolin-óxido comenzó con la construcción del anillo tetrahydroquinolínico usando la reacción de imino Diels-Alder de tres componentes (4-nitrobenzaldehído, N-vinilpirrolidin-2-ona y anilina), seguida con la reacción de oxidación del anillo de la tetrahydroquinolina según el protocolo publicado en Meléndez-Gómez *et al.* (2008), consiguiendo el anillo quinolínico. Luego, se hicieron dos pasos sintéticos (protocolo <http://www.oc-praktikum.de>) completando la síntesis de 4 etapas (Figura 8).

Figura 8. Tercer grupo de quinolinas evaluadas



**Esquema general de síntesis**



**2.3 CEPA DE ENSAYO Y CONDICIONES DE CULTIVO**

Para los ensayos biológicos, se usó la enterobacteria *Escherichia coli* cepa PQ37 (*F- thr leu his-4 pyrD thi galE galK or galT lac ΔU169 srl300::Tn10 rpoB rpsL rfa trp::Muc+ sfiA::Mud(Ap, lac)cts*) recomendada para la detección de carcinógenos

genotóxicos (Quillardet *et al.*, 1982); la cual fue gentilmente suministrada por la Dra. Montserrat Llagostera Casal del Laboratorio de Genética y Microbiología de la Facultad de Ciencias de la Universidad Autónoma de Barcelona.

La cepa PQ37 se cultivó durante toda la noche en medio Luria-Bertani (10 g Triptona/L, 5 g Extracto de Levadura/L, 10 g Cloruro de Sodio/L, pH 7.4) suplementado con ampicilina (50 µg/mL) y tetraciclina (17 µg/mL), bajo condiciones de agitación (100 rpm) y a una temperatura de 37 °C. Para ello, se tomó una alícuota de la cepa conservada y se inoculó en 2 mL de medio Luria-Bertani (LB). Al día siguiente, el cultivo se diluyó en medio fresco (2 mL de cultivo crecido en 20 mL de LB) y se dejó crecer bajo las mismas condiciones experimentales descritas anteriormente hasta que alcanzó una densidad óptica  $DO_{600nm}$  de 0.44.

## **2.4 ENSAYO DE GENOTOXICIDAD**

El ensayo de genotoxicidad se desarrolló siguiendo la metodología descrita por Quillardet & Hofnung (1985). Cuando fueron evaluados compuestos que requieren activación metabólica (derivados quinolónicos comerciales,- hidroxí y cloro sustituidas, quinolinas variadas en las sustituciones de 2-fenilquinolinas, 2-(3,4-metilendioxfenil)quinolinas y 4-metil-2-piridilquinolinas), el cultivo de la cepa *E. coli* PQ37 crecido hasta una  $DO_{600nm} = 0.44$ , fue diluido 10 veces en mezcla de activación metabólica (Ver Anexo A); mientras que en los ensayos de compuestos que no la requieren (análogos del 4-NQO), la dilución del cultivo se hizo en medio LB. El cultivo diluido fue dispensado a razón de 150 µL por tubo Eppendorf que contenía 5 µL de la sustancia a evaluar y la mezcla se incubó durante 30 minutos a 8°C. Por último, las células fueron incubadas durante 2 horas a 37 °C con agitación (300 rpm) para la inducción del gen reportero. Cada experimento incluyó

un control negativo (agua destilada) y controles positivos que fueron específicos para los ensayos con activación metabólica (50  $\mu\text{M}$  de B[a]P) y sin activación metabólica (2,3  $\mu\text{M}$  de 4-NQO). Todas las concentraciones de los compuestos ensayados, fueron determinadas experimentalmente por medio de curvas dosis-efecto genotóxico. En todos los casos, se desarrollaron al menos tres experimentos independientes con cuatro replicas cada uno.

**2.4.1 Ensayos enzimáticos.** Los ensayos enzimáticos  $\beta$ -galactosidasa y fosfatasa alcalina se desarrollaron en microplacas para ELISA de 96 pozos (Brand GMBH, Alemania), siguiendo los procedimientos descritos a continuación:

**2.4.1.1 Ensayo enzimático  $\beta$ -Galactosidasa ( $\beta$ -G).** En cada pocillo de las microplacas se mezclaron 135  $\mu\text{L}$  de Buffer Z (Ver Anexo A) con 15  $\mu\text{L}$  de células de cada tratamiento y se incubaron durante 20 minutos a 37°C para que ocurriera la lisis celular. La reacción enzimática se inició con la adición de 30  $\mu\text{L}$  de solución del sustrato (ONPG) de la  $\beta$ -galactosidasa (Ver Anexo A) y se incubó por 40 minutos a temperatura ambiente para el desarrollo de color. La reacción enzimática se detuvo añadiendo 100  $\mu\text{L}$  de la solución de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (1M).

**2.4.1.2 Ensayo Enzimático Fosfatasa Alcalina (FA).** En cada pocillo de las microplacas, se mezclaron 135  $\mu\text{L}$  de Buffer T (Ver Anexo A) con 15  $\mu\text{L}$  de células de cada tratamiento y se incubaron durante 20 minutos a 37°C para que ocurriera la lisis celular. La reacción enzimática se inició con la adición de 30  $\mu\text{L}$  de solución del sustrato (PNPP) de la fosfatasa alcalina (Ver Anexo A) y se incubó durante 40 minutos a temperatura ambiente para desarrollo de color. La reacción se detuvo añadiendo 50  $\mu\text{L}$  de la solución de HCl (2,5M) y se estabilizó pH adicionando 50  $\mu\text{L}$  de solución TRIS (2M).

Las lecturas de cada ensayo enzimático se hicieron a una densidad óptica de 420 nm ( $DO_{420nm}$ ) usando un espectrofotómetro Multiskan Go (Thermo SCIENTIFIC Inc., Milford, MA, USA).

Las unidades enzimáticas de la actividad  $\beta$ -G y FA fueron calculadas según se indica a continuación:

$$\text{Unidades enzimáticas} = \frac{1000 * A_{420}}{t}$$

Donde  $A_{420}$  es la medida de la densidad óptica de la mezcla de incubación leída a  $420_{nm}$  y  $t$  es el tiempo de incubación en presencia del sustrato (ONPG o PNPP) en minutos.

La relación (R) de las unidades enzimáticas de  $\beta$ -G y FA refleja la inducción del gen *sulA*, incluso cuando se produce inhibición de la síntesis de proteínas.

$$R = \frac{\text{Unidades } \beta - \text{galactosidasa}}{\text{Unidades fosfatasa alcalina}}$$

**2.4.2 Cálculo del Factor de Inducción SOS.** Se empleó como criterio de genotoxicidad el factor de inducción SOS (FI), el cual representa los datos de inducción del gen *sulA* normalizados en cada tratamiento y se considera una medida indirecta del daño primario (genotoxicidad) inducido en el ADN. El FI se calculó como sigue:

$$FI = \frac{R_c}{R_0}$$

Donde  $R_C$  son las células tratadas y  $R_0$  son las células no tratadas.

La interpretación de los resultados se realizó considerando lo siguiente: *i)* “no genotóxico”, valores de FI menores de 1.5 *ii)* “inconclusos”, valores de FI entre 1.5–2.0 y *iii)* “genotóxico”, valores mayores de 2.0 y una clara relación dosis-efecto.

**2.4.3 Cálculo de la potencia de inducción SOS (SOSIP).** La potencia genotóxica de un compuesto está determinada por un único parámetro, la potencia de inducción SOS (SOSIP). El SOSIP es una expresión cuantitativa de la capacidad para inducir el gen *sulA* en *E.coli* PQ37 y representa la pendiente de la región lineal de la curva dosis-FI. Este se calcula como sigue:

$$SOSIP = \frac{\Delta FI}{\Delta C}$$

Donde  $\Delta FI$  es la diferencia entre dos puntos de la región lineal de la curva dosis respuesta y  $\Delta C$  es la diferencia entre las concentraciones respectivas.

## 2.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS

Se calcularon los valores promedio de la  $\beta$ -galactosidasa, de fosfatasa alcalina y del factor de inducción con sus correspondientes errores estándar. La normalidad de los datos fue probada mediante el test de Kolmogorov-Smirnov. La homogeneidad de varianza se comprobó mediante un ANOVA. Los valores promedios de cada tratamiento se compararon con el control negativo usando una prueba de Dunnet. El análisis de correlación Producto-momento (Pearson) se

utilizó para examinar la relación dosis-respuesta en el estudio de genotoxicidad. Para todos los análisis estadísticos, se utilizó el paquete de software STATISTICA V.6 (Versión 6.0, StatSoft Inc (2003), Tulsa, OK, USA) considerando una  $p < 0,05$ .

### 3. RESULTADOS

#### 3.1 INDUCCIÓN DE LA RESPUESTA SOS POR TRATAMIENTOS CON LOS MUTÁGENOS DE REFERENCIA 4-NITROQUINOLIN-1-ÓXIDO Y BENZO[a]PIRENO

En el presente estudio, se usaron los mutágenos de referencia 4-nitroquinolin-1-óxido (4-NQO) y benzo[a]pireno (B[a]P) como controles positivos de inducción de la respuesta SOS en presencia y ausencia de activación metabólica (fracción S9), respectivamente. Las cinéticas de inducción del gen *sulA* en *E. coli* PQ37 producto de tratamientos con los mutágenos B[a]P y 4-nitroquinolin-1-óxido, son mostradas en la Figuras 9 y 10, respectivamente. Los valores de Factor de Inducción (FI) indican que el nivel de inducción del gen *sulA* dependió de la dosis del mutágeno, alcanzando su mayor nivel con las dosis 50 $\mu$ M y 0,27 $\mu$ M, respectivamente. Las mencionadas dosis, no producen reducción de la actividad fosfatasa constitutiva, indicando que estas no resultan tóxicas en el modelo experimental usado (SOS Chromotest).

Figura 9. Cinética de inducción del gen *sulA* en *E. coli* PQ37 por tratamiento con benzo[a]pireno

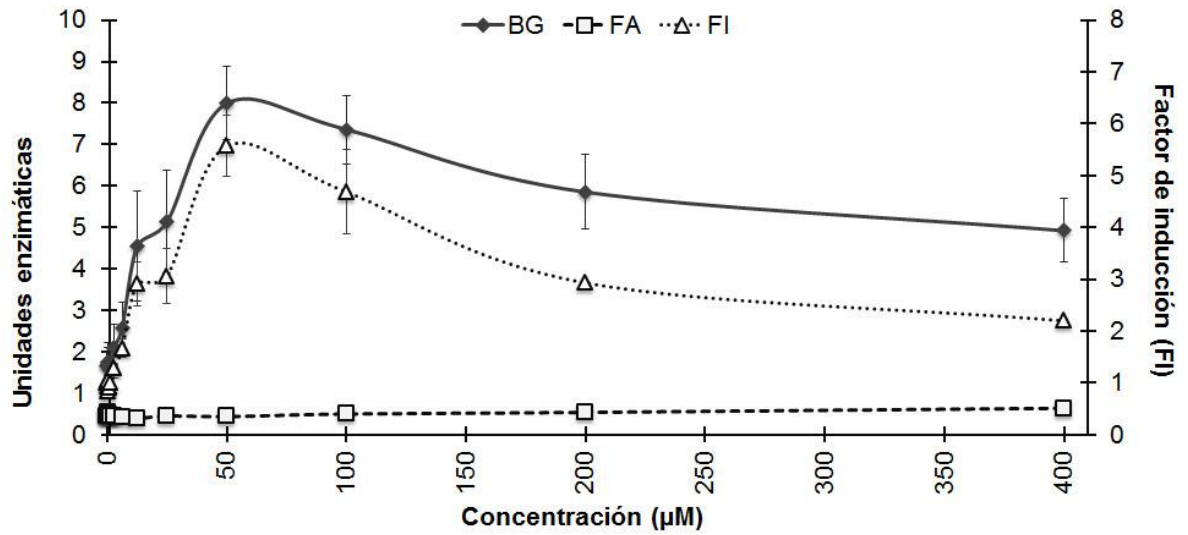
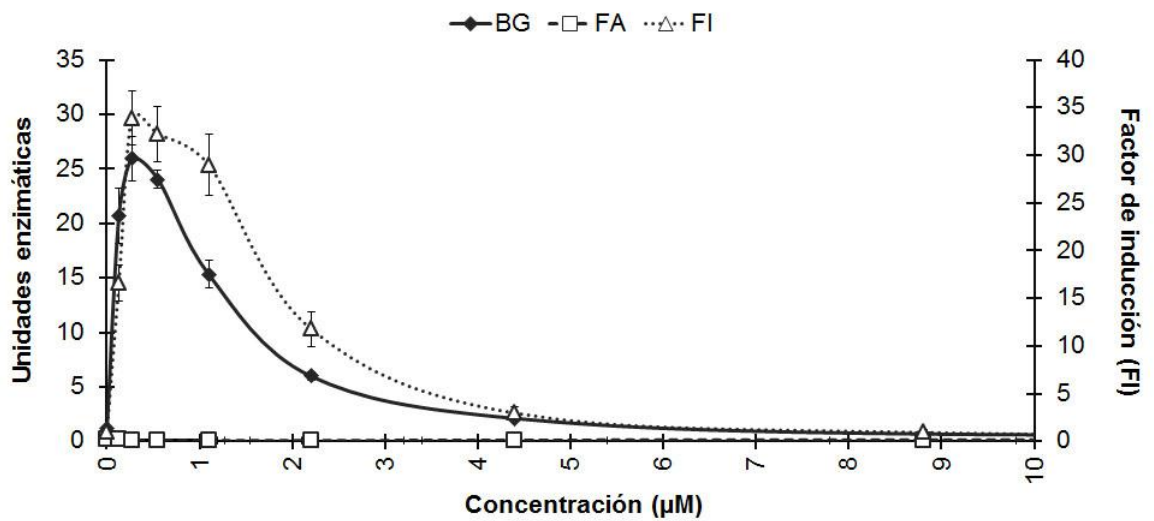


Figura 10. Cinética de inducción del gen *sulA* en *E. coli* PQ37 por tratamiento con el 4-nitroquinolin-1-óxido



Con base en los resultados anteriormente mostrados, se escogieron las dosis 50µM de B[a]P y 0,27µM de 4-NQO como controles positivos (en presencia y ausencia de activación metabólica, respectivamente), durante los ensayos de evaluación genotóxica de las quinolinas en estudio.

### 3.2 GENOTOXICIDAD DE DERIVADOS DE LA QUINOLINA

Los valores promedio de FI y sus respectivos errores estándar para los ensayos de genotoxicidad de quinolinas en presencia y ausencia de activación metabólica, son mostrados en la Tabla 3. Para comparación, fueron siempre incluidos los controles positivos en presencia (B[a]P) y ausencia (4-NQO) de activación metabólica.

Tabla 3. Valores promedios del Factor de Inducción SOS (FI) obtenidos para derivados de la quinolina usando el SOS Chromotest

Compuestos	Tratamientos	FI (Con S9)	FI (Sin S9) <sup>†</sup>
<p>quinolina 1</p>	Control negativo	1,00 ± 0,09	1,00 ± 0,06
	Control positivo 1	-	11,13 ± 1,29 *
	Control positivo 2	3,08 ± 0,39 *	-
	0.13 µM	1,07 ± 0,18 <sup>n.s</sup>	0,95 ± 0,20 <sup>n.s</sup>
	0.27 µM	0,89 ± 0,12 <sup>n.s</sup>	0,94 ± 0,17 <sup>n.s</sup>
	0.55 µM	0,87 ± 0,11 <sup>n.s</sup>	0,88 ± 0,09 <sup>n.s</sup>
	1.1 µM	0,82 ± 0,21 <sup>n.s</sup>	1,02 ± 0,22 <sup>n.s</sup>
	2.2 µM	0,94 ± 0,16 <sup>n.s</sup>	1,06 ± 0,23 <sup>n.s</sup>
	4.4 µM	0,90 ± 0,08 <sup>n.s</sup>	1,00 ± 0,17 <sup>n.s</sup>
	8.8 µM	1,01 ± 0,10 <sup>n.s</sup>	1,15 ± 0,12 <sup>n.s</sup>
	17.6 µM	1,10 ± 0,19 <sup>n.s</sup>	0,83 ± 0,20 <sup>n.s</sup>
	35.2 µM	1,22 ± 0,16 <sup>n.s</sup>	0,56 ± 0,13 <sup>n.s</sup>
	70.5 µM	0,98 ± 0,16 <sup>n.s</sup>	0,25 ± 0,07 <sup>n.s</sup>
	141.0 µM	0,96 ± 0,18 <sup>n.s</sup>	0,18 ± 0,05 <sup>n.s</sup>
282.0 µM	0,76 ± 0,12 <sup>n.s</sup>	0,31 ± 0,13 <sup>n.s</sup>	

Tabla 3. (Continuación)

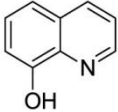
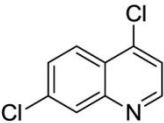
Compuestos	Tratamientos	FI (S9)	FI (Sin S9) <sup>†</sup>
 8-hidroxiquinolina <b>2</b>	Control negativo	1,00 ± 0,04	1,00 ± 0,14
	Control positivo 1	-	4,80 ± 0,89 *
	Control positivo 2	3,33 ± 0,50 *	-
	0.13 µM	0,99 ± 0,13 <sup>n.s</sup>	0,67 ± 0,15 <sup>n.s</sup>
	0.27 µM	0,99 ± 0,18 <sup>n.s</sup>	0,77 ± 0,14 <sup>n.s</sup>
	0.55 µM	1,10 ± 0,07 <sup>n.s</sup>	0,72 ± 0,16 <sup>n.s</sup>
	1.1 µM	1,10 ± 0,07 <sup>n.s</sup>	0,60 ± 0,09 <sup>n.s</sup>
	2.2 µM	1,06 ± 0,09 <sup>n.s</sup>	0,66 ± 0,12 <sup>n.s</sup>
	4.4 µM	1,00 ± 0,04 <sup>n.s</sup>	0,71 ± 0,16 <sup>n.s</sup>
	8.8 µM	1,21 ± 0,06 <sup>n.s</sup>	0,72 ± 0,10 <sup>n.s</sup>
	17.6 µM	1,19 ± 0,12 <sup>n.s</sup>	0,70 ± 0,15 <sup>n.s</sup>
	35.2 µM	1,31 ± 0,11 <sup>n.s</sup>	0,53 ± 0,09 <sup>n.s</sup>
	70.5 µM	1,20 ± 0,14 <sup>n.s</sup>	0,52 ± 0,15 <sup>n.s</sup>
	141µM	0,75 ± 0,07 <sup>n.s</sup>	0,45 ± 0,01 <sup>n.s</sup>
282 µM	0,50 ± 0,03 <sup>n.s</sup>	0,24 ± 0,07 <sup>n.s</sup>	
 4,7-dicloroquinolina <b>3</b>	Control negativo	1,00 ± 0,05	1,00 ± 0,07
	Control positivo 1	-	12,72 ± 1,44
	Control positivo 2	3,37 ± 0,30	-
	0.13 µM	0,88 ± 0,09 <sup>n.s</sup>	1,16 ± 0,15 <sup>n.s</sup>
	0.27 µM	1,14 ± 0,14 <sup>n.s</sup>	1,18 ± 0,13 <sup>n.s</sup>
	0.55 µM	1,09 ± 0,11 <sup>n.s</sup>	1,32 ± 0,14 <sup>n.s</sup>
	1.1 µM	0,99 ± 0,16 <sup>n.s</sup>	0,62 ± 0,07 <sup>n.s</sup>
	2.2 µM	1,04 ± 0,07 <sup>n.s</sup>	0,88 ± 0,11 <sup>n.s</sup>
	4.4 µM	0,98 ± 0,09 <sup>n.s</sup>	0,95 ± 0,15 <sup>n.s</sup>
	8.8 µM	1,26 ± 0,37 <sup>n.s</sup>	1,16 ± 0,37 <sup>n.s</sup>
	17.6 µM	1,14 ± 0,13 <sup>n.s</sup>	0,97 ± 0,29 <sup>n.s</sup>
	35.2 µM	1,09 ± 0,17 <sup>n.s</sup>	0,84 ± 0,13 <sup>n.s</sup>
	70.5 µM	1,08 ± 0,14 <sup>n.s</sup>	0,93 ± 0,22 <sup>n.s</sup>
	141µM	0,87 ± 0,13 <sup>n.s</sup>	0,92 ± 0,23 <sup>n.s</sup>
282 µM	0,56 ± 0,08 <sup>n.s</sup>	0,55 ± 0,07 <sup>n.s</sup>	

Tabla 3. (Continuación)

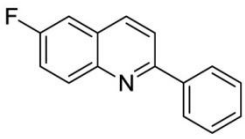
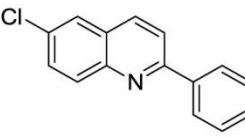
Compuesto	Tratamientos	FI (S9)	FI (Sin S9) <sup>†</sup>
 <p>6-fluoro-2-fenilquinolina <b>4</b></p>	Control negativo	1,00 ± 0,12	1,00 ± 0,10
	Control positivo 1	-	14,20 ± 3,35 *
	Control positivo 2	3,31 ± 0,29 *	-
	0.13 µM	1,11 ± 0,15 <sup>n.s</sup>	1,10 ± 0,32 <sup>n.s</sup>
	0.27 µM	1,04 ± 0,13 <sup>n.s</sup>	0,96 ± 0,14 <sup>n.s</sup>
	0.55 µM	0,93 ± 0,15 <sup>n.s</sup>	0,98 ± 0,19 <sup>n.s</sup>
	1.1 µM	1,09 ± 0,05 <sup>n.s</sup>	1,13 ± 0,14 <sup>n.s</sup>
	2.2 µM	1,17 ± 0,16 <sup>n.s</sup>	1,25 ± 0,20 <sup>n.s</sup>
	4.4 µM	0,99 ± 0,13 <sup>n.s</sup>	1,20 ± 0,25 <sup>n.s</sup>
	8.8 µM	0,99 ± 0,08 <sup>n.s</sup>	1,21 ± 0,21 <sup>n.s</sup>
	17.6 µM	1,02 ± 0,08 <sup>n.s</sup>	1,23 ± 0,13 <sup>n.s</sup>
	35.2 µM	0,91 ± 0,08 <sup>n.s</sup>	1,23 ± 0,09 <sup>n.s</sup>
	70.5 µM	0,89 ± 0,09 <sup>n.s</sup>	1,30 ± 0,20 <sup>n.s</sup>
	141 µM	0,91 ± 0,07 <sup>n.s</sup>	1,46 ± 0,14 <sup>n.s</sup>
282 µM	0,75 ± 0,04 <sup>n.s</sup>	1,27 ± 0,15 <sup>n.s</sup>	
 <p>6-cloro-2-fenilquinolina <b>5</b></p>	Control negativo	1,00 ± 0,07	1,00 ± 0,04
	Control positivo 1	-	13,56 ± 3,67 *
	Control positivo 2	2,25 ± 0,48 *	-
	0.13 µM	0,93 ± 0,06 <sup>n.s</sup>	0,89 ± 0,10 <sup>n.s</sup>
	0.27 µM	0,95 ± 0,04 <sup>n.s</sup>	1,01 ± 0,11 <sup>n.s</sup>
	0.55 µM	1,00 ± 0,06 <sup>n.s</sup>	0,89 ± 0,07 <sup>n.s</sup>
	1.1 µM	1,04 ± 0,05 <sup>n.s</sup>	0,88 ± 0,09 <sup>n.s</sup>
	2.2 µM	1,08 ± 0,10 <sup>n.s</sup>	1,10 ± 0,14 <sup>n.s</sup>
	4.4 µM	1,19 ± 0,13 <sup>n.s</sup>	0,87 ± 0,12 <sup>n.s</sup>
	8.8 µM	0,74 ± 0,17 <sup>n.s</sup>	1,00 ± 0,14 <sup>n.s</sup>
	17.6 µM	0,81 ± 0,09 <sup>n.s</sup>	0,85 ± 0,05 <sup>n.s</sup>
	35.2 µM	0,69 ± 0,10 <sup>n.s</sup>	1,08 ± 0,10 <sup>n.s</sup>
	70.5 µM	0,85 ± 0,18 <sup>n.s</sup>	0,94 ± 0,07 <sup>n.s</sup>
	141 µM	0,77 ± 0,18 <sup>n.s</sup>	0,94 ± 0,05 <sup>n.s</sup>
282 µM	0,85 ± 0,19 <sup>n.s</sup>	0,91 ± 0,07 <sup>n.s</sup>	

Tabla 3. (Continuación)

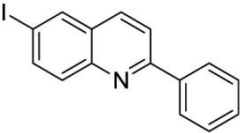
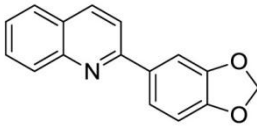
Compuesto	Tratamientos	FI (S9)	FI (Sin S9) †
 <p>6-iodo-2-fenilquinolina <b>6</b></p>	Control negativo	1,00 ± 0,08	1,00 ± 0,06
	Control positivo 1	-	15,35 ± 2,89 *
	Control positivo 2	3,29 ± 0,39 *	-
	0.13 µM	1,00 ± 0,18 <sup>n.s</sup>	0,96 ± 0,06 <sup>n.s</sup>
	0.27 µM	0,95 ± 0,08 <sup>n.s</sup>	0,86 ± 0,09 <sup>n.s</sup>
	0.55 µM	1,01 ± 0,13 <sup>n.s</sup>	0,99 ± 0,08 <sup>n.s</sup>
	1.1 µM	0,96 ± 0,13 <sup>n.s</sup>	1,01 ± 0,10 <sup>n.s</sup>
	2.2 µM	1,04 ± 0,15 <sup>n.s</sup>	0,97 ± 0,12 <sup>n.s</sup>
	4.4 µM	0,89 ± 0,15 <sup>n.s</sup>	0,90 ± 0,09 <sup>n.s</sup>
	8.8 µM	1,03 ± 0,21 <sup>n.s</sup>	0,80 ± 0,08 <sup>n.s</sup>
	17.6 µM	1,01 ± 0,14 <sup>n.s</sup>	0,87 ± 0,12 <sup>n.s</sup>
	35.2 µM	0,87 ± 0,09 <sup>n.s</sup>	0,82 ± 0,10 <sup>n.s</sup>
	70.5 µM	0,90 ± 0,09 <sup>n.s</sup>	0,99 ± 0,11 <sup>n.s</sup>
	141 µM	0,86 ± 0,21 <sup>n.s</sup>	0,88 ± 0,13 <sup>n.s</sup>
282 µM	0,77 ± 0,20 <sup>n.s</sup>	0,86 ± 0,18 <sup>n.s</sup>	
 <p>2-(3,4-metilendioxi-fenil) quinolina <b>7</b></p>	Control negativo	1,00 ± 0,01	1,00 ± 0,28
	Control positivo 1	-	11,06 ± 1,39 *
	Control positivo 2	3,01 ± 0,19 *	-
	0.13 µM	1,00 ± 0,02 <sup>n.s</sup>	1,13 ± 0,06 <sup>n.s</sup>
	0.27 µM	0,73 ± 0,08 <sup>n.s</sup>	1,12 ± 0,04 <sup>n.s</sup>
	0.55 µM	0,96 ± 0,11 <sup>n.s</sup>	1,14 ± 0,14 <sup>n.s</sup>
	1.1 µM	1,07 ± 0,03 <sup>n.s</sup>	0,77 ± 0,17 <sup>n.s</sup>
	2.2 µM	1,09 ± 0,11 <sup>n.s</sup>	0,81 ± 0,19 <sup>n.s</sup>
	4.4 µM	0,91 ± 0,11 <sup>n.s</sup>	0,77 ± 0,14 <sup>n.s</sup>
	8.8 µM	0,99 ± 0,03 <sup>n.s</sup>	1,00 ± 0,20 <sup>n.s</sup>
	17.6 µM	0,95 ± 0,13 <sup>n.s</sup>	0,85 ± 0,12 <sup>n.s</sup>
	35.2 µM	0,86 ± 0,05 <sup>n.s</sup>	0,90 ± 0,09 <sup>n.s</sup>
	70.5 µM	0,82 ± 0,04 <sup>n.s</sup>	0,75 ± 0,12 <sup>n.s</sup>
	141 µM	0,86 ± 0,05 <sup>n.s</sup>	0,84 ± 0,07 <sup>n.s</sup>
282 µM	0,84 ± 0,06 <sup>n.s</sup>	0,54 ± 0,14 <sup>n.s</sup>	

Tabla 3. (Continuación)

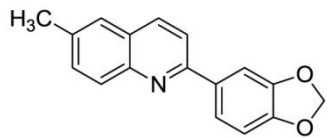
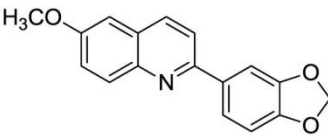
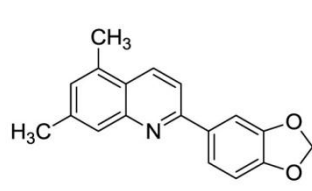
Compuesto	Tratamientos	FI (S9)	FI (Sin S9) †
 <p>2-(3,4-metilendioxfenil) 6-metilquinolina <b>8</b></p>	Control negativo	1,00 ± 0,05	1,00 ± 0,04
	Control positivo 1	-	12,45 ± 2,52 *
	Control positivo 2	3,62 ± 0,30 *	-
	0.13 µM	1,20 ± 0,14 <sup>n.s</sup>	0,93 ± 0,05 <sup>n.s</sup>
	0.27 µM	0,86 ± 0,12 <sup>n.s</sup>	0,95 ± 0,11 <sup>n.s</sup>
	0.55 µM	1,06 ± 0,17 <sup>n.s</sup>	0,94 ± 0,06 <sup>n.s</sup>
	1.1 µM	0,91 ± 0,17 <sup>n.s</sup>	0,83 ± 0,06 <sup>n.s</sup>
	2.2 µM	1,01 ± 0,10 <sup>n.s</sup>	0,79 ± 0,08 <sup>n.s</sup>
	4.4 µM	0,83 ± 0,06 <sup>n.s</sup>	0,80 ± 0,11 <sup>n.s</sup>
	8.8 µM	0,88 ± 0,10 <sup>n.s</sup>	0,94 ± 0,15 <sup>n.s</sup>
	17.6 µM	0,79 ± 0,05 <sup>n.s</sup>	0,88 ± 0,11 <sup>n.s</sup>
	35.2 µM	0,92 ± 0,09 <sup>n.s</sup>	0,84 ± 0,09 <sup>n.s</sup>
	70.5 µM	0,82 ± 0,06 <sup>n.s</sup>	0,94 ± 0,15 <sup>n.s</sup>
	141µM	0,80 ± 0,06 <sup>n.s</sup>	0,78 ± 0,12 <sup>n.s</sup>
282 µM	0,81 ± 0,08 <sup>n.s</sup>	0,68 ± 0,06 <sup>n.s</sup>	
 <p>2-(3,4-metilendioxfenil) 6-metoxiquinolina <b>9</b></p>	Control negativo	1,00 ± 0,06	1,00 ± 0,10
	Control positivo 1	-	11,28 ± 1,47 *
	Control positivo 2	3,03 ± 0,40 *	-
	0.13 µM	1,14 ± 0,10 <sup>n.s</sup>	1,07 ± 0,11 <sup>n.s</sup>
	0.27 µM	1,10 ± 0,11 <sup>n.s</sup>	1,02 ± 0,09 <sup>n.s</sup>
	0.55 µM	0,86 ± 0,06 <sup>n.s</sup>	0,98 ± 0,08 <sup>n.s</sup>
	1.1 µM	1,12 ± 0,07 <sup>n.s</sup>	1,02 ± 0,10 <sup>n.s</sup>
	2.2 µM	1,08 ± 0,08 <sup>n.s</sup>	0,99 ± 0,12 <sup>n.s</sup>
	4.4 µM	1,12 ± 0,07 <sup>n.s</sup>	0,93 ± 0,14 <sup>n.s</sup>
	8.8 µM	1,15 ± 0,14 <sup>n.s</sup>	0,89 ± 0,12 <sup>n.s</sup>
	17.6 µM	1,21 ± 0,13 <sup>n.s</sup>	0,89 ± 0,12 <sup>n.s</sup>
	35.2 µM	1,15 ± 0,13 <sup>n.s</sup>	0,86 ± 0,10 <sup>n.s</sup>
	70.5 µM	1,18 ± 0,09 <sup>n.s</sup>	0,84 ± 0,14 <sup>n.s</sup>
	141µM	1,27 ± 0,29 <sup>n.s</sup>	0,92 ± 0,08 <sup>n.s</sup>
282 µM	0,76 ± 0,11 <sup>n.s</sup>	0,92 ± 0,05 <sup>n.s</sup>	

Tabla 3. (Continuación)

Compuesto	Tratamientos	FI (S9)	FI (Sin S9) †
 <p>2-(3,4-metilendioxifenil) 5,7-dimetilquinolina <b>10</b></p>	Control negativo	1,00 ± 0,06	1,00 ± 0,06
	Control positivo 1	-	10,63 ± 0,99 *
	Control positivo 2	2,86 ± 0,47 *	-
	0.13 µM	0,72 ± 0,16 <sup>n.s.</sup>	1,31 ± 0,17 <sup>n.s.</sup>
	0.27 µM	0,81 ± 0,18 <sup>n.s.</sup>	1,24 ± 0,17 <sup>n.s.</sup>
	0.55 µM	0,82 ± 0,17 <sup>n.s.</sup>	1,10 ± 0,10 <sup>n.s.</sup>
	1.1 µM	0,76 ± 0,12 <sup>n.s.</sup>	0,90 ± 0,16 <sup>n.s.</sup>
	2.2 µM	0,94 ± 0,17 <sup>n.s.</sup>	0,97 ± 0,10 <sup>n.s.</sup>
	4.4 µM	0,93 ± 0,16 <sup>n.s.</sup>	0,93 ± 0,08 <sup>n.s.</sup>
	8.8 µM	0,96 ± 0,13 <sup>n.s.</sup>	0,91 ± 0,10 <sup>n.s.</sup>
	17.6 µM	0,97 ± 0,12 <sup>n.s.</sup>	0,82 ± 0,10 <sup>n.s.</sup>
	35.2 µM	0,97 ± 0,04 *	0,66 ± 0,14 <sup>n.s.</sup>
	70.5 µM	0,91 ± 0,06 <sup>n.s.</sup>	0,81 ± 0,07 <sup>n.s.</sup>
	141 µM	0,89 ± 0,06 <sup>n.s.</sup>	0,78 ± 0,10 <sup>n.s.</sup>
282 µM	0,89 ± 0,15 <sup>n.s.</sup>	0,68 ± 0,12 <sup>n.s.</sup>	

**FI:** Valores promedios del Factor de Inducción calculados a partir de un mínimo de tres experimentos independientes con cuatro replicas cada uno y sus correspondientes errores estándar. Como control negativo se usó agua destilada. Como control positivo 1 se usó el 4-NQO y como control positivo 2 se usó el B[a]P. \*: Diferencia significativa ( $p < 0.05$  usando test de Dunnet) respecto al control negativo. **n.s.:** No se encontró diferencia significativa.

De acuerdo a los resultados, la quinolina (**1**), compuesto de referencia estructural, y los compuestos del grupo 1 no lograron inducir la respuesta SOS en *E. coli* PQ37. La incorporación de un átomo de cloro en las posiciones C-4 y C-7 del esqueleto de quinolina (**3**) y de átomos halogenados (F, Cl e I) en la posición C-6 de la 2-fenilquinolina (**4-6**) no llevó a modificaciones en la genotoxicidad de la molécula. Asimismo, la incorporación del grupo 3,4-metilendioxofenilo en la posición C-2 de la parte piridínica de la molécula (**7**) no modificó la actividad de la quinolina. Igualmente, la sustitución con el grupo metilo en posiciones C-6 y C-7, y con el grupo metoxi en posición C-6 de la 3,4-metilendioxofenilquinolina (**8-10**) no mostraron importancia en el patrón de genotoxicidad. En consecuencia, no se pudo determinar la existencia de una relación estructura-actividad para quinolinas

con el ensayo SOS chromotest. La cinética de inducción del gen *suIA* por tratamiento con las quinolinas del grupo 1 es mostrada en el Anexo B en contraste con el control positivo para ensayos con activación metabólica.

### 3.3 GENOTOXICIDAD DE DERIVADOS DE LA 4-METILQUINOLINA

Los valores promedio de FI y sus respectivos errores estándar para los ensayos de genotoxicidad de las 4-metilquinolinas C2-piridinil sustituidas y la 4-metilquinolina en presencia y ausencia de activación metabólica, son mostrados en la Tabla 4. Para comparación, fueron siempre incluidos los controles positivos en presencia (B[a]P) y ausencia (4-NQO) de activación metabólica.

Tabla 4. Valores promedios de Factor de Inducción SOS (FI) obtenidos para derivados de la 4-metilquinolina usando el SOS Chromotest

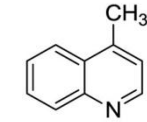
Compuestos	Tratamientos	FI (Con S9)	FI (Sin S9) <sup>†</sup>
 <p>4-metilquinolina 11</p>	Control negativo	1,00 ± 0,06	1,00 ± 0,02
	Control positivo 1	-	9,98 ± 2,47 *
	Control positivo 2	4,63 ± 1,35 *	-
	0.13 µM	1,03 ± 0,10 <sup>n.s</sup>	0,88 ± 0,12 <sup>n.s</sup>
	0.27 µM	0,91 ± 0,13 <sup>n.s</sup>	0,93 ± 0,13 <sup>n.s</sup>
	0.55 µM	1,06 ± 0,17 <sup>n.s</sup>	0,87 ± 0,13 <sup>n.s</sup>
	1.1 µM	0,96 ± 0,11 <sup>n.s</sup>	0,97 ± 0,13 <sup>n.s</sup>
	2.2 µM	1,10 ± 0,12 <sup>n.s</sup>	0,93 ± 0,13 <sup>n.s</sup>
	4.4 µM	1,28 ± 0,18 <sup>n.s</sup>	0,82 ± 0,10 <sup>n.s</sup>
	8.8 µM	1,34 ± 0,22 *	0,63 ± 0,12 <sup>n.s</sup>
	17.6 µM	1,50 ± 0,45 *	0,63 ± 0,04 <sup>n.s</sup>
	35.2 µM	1,61 ± 0,29 *	0,40 ± 0,04 <sup>n.s</sup>
	70.5 µM	1,55 ± 0,30 *	0,36 ± 0,05 <sup>n.s</sup>
	141 µM	1,53 ± 0,34 *	0,24 ± 0,03 <sup>n.s</sup>
282 µM	1,35 ± 0,12 *	0,30 ± 0,05 <sup>n.s</sup>	

Tabla 4. (Continuación)

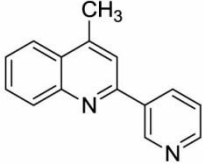
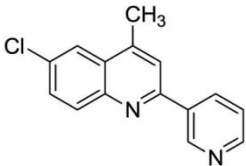
Compuestos	Tratamientos	FI (Con S9)	FI (Sin S9) <sup>†</sup>
 <p>4-metil-2-(piridinil) quinolina <b>12</b></p>	Control negativo	1,00 ± 0,03	1,00 ± 0,03
	Control positivo 1	-	12,52 ± 1,57*
	Control positivo 2	3,98 ± 1,20*	-
	0.13 µM	1,04 ± 0,11 <sup>n.s</sup>	1,10 ± 0,07 <sup>n.s</sup>
	0.27 µM	1,00 ± 0,23 <sup>n.s</sup>	1,07 ± 0,08 <sup>n.s</sup>
	0.55 µM	0,98 ± 0,16 <sup>n.s</sup>	1,06 ± 0,10 <sup>n.s</sup>
	1.1 µM	1,02 ± 0,18 <sup>n.s</sup>	1,10 ± 0,04 <sup>n.s</sup>
	2.2 µM	1,11 ± 0,20 <sup>n.s</sup>	1,09 ± 0,08 <sup>n.s</sup>
	4.4 µM	1,00 ± 0,17 <sup>n.s</sup>	1,08 ± 0,28 <sup>n.s</sup>
	8.8 µM	1,07 ± 0,13 <sup>n.s</sup>	1,08 ± 0,03 <sup>n.s</sup>
	17.6 µM	1,08 ± 0,16 <sup>n.s</sup>	1,04 ± 0,09 <sup>n.s</sup>
	35.2 µM	1,12 ± 0,14 <sup>n.s</sup>	1,16 ± 0,09 <sup>n.s</sup>
	70.5 µM	0,94 ± 0,11 <sup>n.s</sup>	1,02 ± 0,06 <sup>n.s</sup>
	141 µM	0,70 ± 0,09 <sup>n.s</sup>	0,89 ± 0,09 <sup>n.s</sup>
282 µM	0,49 ± 0,03 <sup>n.s</sup>	0,79 ± 0,19 <sup>n.s</sup>	
 <p>6-cloro-4-metil-2-(piridinil) quinolina <b>13</b></p>	Control negativo	1,00 ± 0,12	1,00 ± 0,07
	Control positivo 1	9,25 ± 1,65*	-
	Control positivo 2	-	4,24 ± 0,47*
	0.13 µM	1,24 ± 0,17 <sup>n.s</sup>	0,91 ± 0,08 <sup>n.s</sup>
	0.27 µM	0,82 ± 0,23 <sup>n.s</sup>	0,92 ± 0,15 <sup>n.s</sup>
	0.55 µM	0,78 ± 0,12 <sup>n.s</sup>	1,11 ± 0,13 <sup>n.s</sup>
	1.1 µM	1,06 ± 0,13 <sup>n.s</sup>	0,97 ± 0,22 <sup>n.s</sup>
	2.2 µM	1,17 ± 0,14 <sup>n.s</sup>	0,92 ± 0,27 <sup>n.s</sup>
	4.4 µM	1,27 ± 0,15 <sup>n.s</sup>	0,94 ± 0,20 <sup>n.s</sup>
	8.8 µM	1,11 ± 0,10 <sup>n.s</sup>	1,13 ± 0,13 <sup>n.s</sup>
	17.6 µM	1,23 ± 0,12 <sup>n.s</sup>	1,05 ± 0,17 <sup>n.s</sup>
	35.2 µM	0,88 ± 0,18 <sup>n.s</sup>	1,06 ± 0,23 <sup>n.s</sup>
	70.5 µM	1,09 ± 0,08 <sup>n.s</sup>	1,14 ± 0,14 <sup>n.s</sup>
	141 µM	0,95 ± 0,07 <sup>n.s</sup>	0,88 ± 0,13 <sup>n.s</sup>
282 µM	0,65 ± 0,12 <sup>n.s</sup>	0,69 ± 0,11 <sup>n.s</sup>	

Tabla 4. (Continuación)

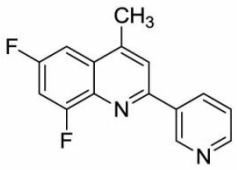
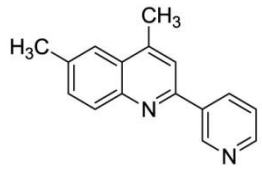
Compuestos	Tratamientos	FI (Con S9)	FI (Sin S9) <sup>†</sup>
 <p>6,8-difluoro-4-metil-2-(piridinil)quinolina <b>14</b></p>	Control negativo	1,00 ± 0,06	1,00 ± 0,11
	Control positivo 1	9,26 ± 0,92*	-
	Control positivo 2	-	3,44 ± 1,18*
	0.13 µM	0,94 ± 0,10 <sup>n.s</sup>	1,27 ± 0,13 <sup>n.s</sup>
	0.27 µM	0,55 ± 0,04 <sup>n.s</sup>	1,02 ± 0,08 <sup>n.s</sup>
	0.55 µM	0,84 ± 0,15 <sup>n.s</sup>	1,12 ± 0,16 <sup>n.s</sup>
	1.1 µM	0,84 ± 0,09 <sup>n.s</sup>	0,92 ± 0,09 <sup>n.s</sup>
	2.2 µM	0,89 ± 0,10 <sup>n.s</sup>	0,92 ± 0,15 <sup>n.s</sup>
	4.4 µM	0,91 ± 0,10 <sup>n.s</sup>	0,85 ± 0,18 <sup>n.s</sup>
	8.8 µM	1,04 ± 0,12 <sup>n.s</sup>	0,67 ± 0,11 <sup>n.s</sup>
	17.6 µM	0,80 ± 0,16 <sup>n.s</sup>	0,70 ± 0,13 <sup>n.s</sup>
	35.2 µM	0,96 ± 0,09 <sup>n.s</sup>	0,57 ± 0,08 <sup>n.s</sup>
	70.5 µM	0,93 ± 0,07 <sup>n.s</sup>	0,58 ± 0,04 <sup>n.s</sup>
141µM	0,88 ± 0,08 <sup>n.s</sup>	0,50 ± 0,02 <sup>n.s</sup>	
282 µM	0,60 ± 0,07 <sup>n.s</sup>	0,28 ± 0,02 <sup>n.s</sup>	
 <p>4,6-dimetil-2-(piridin-5-il)quinolina <b>15</b></p>	Control negativo	1,00 ± 0,05	1,00 ± 0,08
	Control positivo 1	16,60 ± 0,86*	-
	Control positivo 2	-	3,47 ± 0,80*
	0.13 µM	1,15 ± 0,09 <sup>n.s</sup>	1,08 ± 0,30 <sup>n.s</sup>
	0.27 µM	1,03 ± 0,08 <sup>n.s</sup>	1,23 ± 0,13 <sup>n.s</sup>
	0.55 µM	1,03 ± 0,07 <sup>n.s</sup>	0,89 ± 0,13 <sup>n.s</sup>
	1.1 µM	1,10 ± 0,20 <sup>n.s</sup>	1,05 ± 0,13 <sup>n.s</sup>
	2.2 µM	1,21 ± 0,24 <sup>n.s</sup>	1,24 ± 0,10 <sup>n.s</sup>
	4.4 µM	1,06 ± 0,14 <sup>n.s</sup>	0,95 ± 0,10 <sup>n.s</sup>
	8.8 µM	1,08 ± 0,17 <sup>n.s</sup>	1,12 ± 0,01 <sup>n.s</sup>
	17.6 µM	1,03 ± 0,10 <sup>n.s</sup>	1,00 ± 0,16 <sup>n.s</sup>
	35.2 µM	1,23 ± 0,16 <sup>n.s</sup>	1,07 ± 0,09 <sup>n.s</sup>
	70.5 µM	1,03 ± 0,19 <sup>n.s</sup>	1,05 ± 0,14 <sup>n.s</sup>
141µM	0,72 ± 0,06 <sup>n.s</sup>	1,01 ± 0,19 <sup>n.s</sup>	
282 µM	0,48 ± 0,09 <sup>n.s</sup>	0,96 ± 0,21 <sup>n.s</sup>	

Tabla 4. (Continuación)

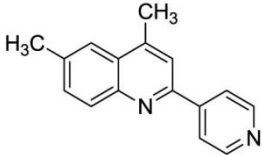
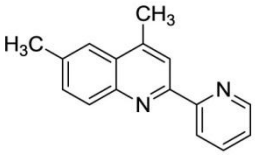
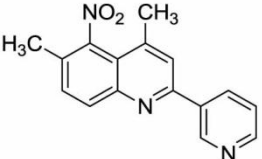
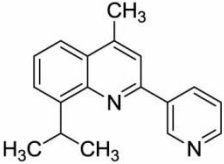
Compuestos	Tratamientos	FI (Con S9)	FI (Sin S9) <sup>†</sup>
 <p>4,6-dimetil-2-(piridin-4-il) quinolina <b>16</b></p>	Control negativo	1,00 ± 0,05	1,00 ± 0,14
	Control positivo 1	8,98 ± 1,23	-
	Control positivo 2	-	2,79 ± 0,40
	0.13 µM	1,12 ± 0,14 <sup>n.s</sup>	1,09 ± 0,34 <sup>n.s</sup>
	0.27 µM	0,95 ± 0,11 <sup>n.s</sup>	0,94 ± 0,20 <sup>n.s</sup>
	0.55 µM	0,92 ± 0,07 <sup>n.s</sup>	0,88 ± 0,20 <sup>n.s</sup>
	1.1 µM	1,24 ± 0,22 <sup>n.s</sup>	0,96 ± 0,18 <sup>n.s</sup>
	2.2 µM	1,32 ± 0,17 <sup>n.s</sup>	1,04 ± 0,23 <sup>n.s</sup>
	4.4 µM	1,33 ± 0,20 <sup>n.s</sup>	0,91 ± 0,15 <sup>n.s</sup>
	8.8 µM	1,31 ± 0,13 <sup>n.s</sup>	1,08 ± 0,18 <sup>n.s</sup>
	17.6 µM	1,22 ± 0,10 <sup>n.s</sup>	1,04 ± 0,09 <sup>n.s</sup>
	35.2 µM	1,32 ± 0,23 <sup>n.s</sup>	1,24 ± 0,16 <sup>n.s</sup>
	70.5 µM	1,31 ± 0,17 <sup>n.s</sup>	0,74 ± 0,13 <sup>n.s</sup>
	141µM	1,01 ± 0,12 <sup>n.s</sup>	0,94 ± 0,19 <sup>n.s</sup>
282 µM	0,84 ± 0,20 <sup>n.s</sup>	0,75 ± 0,18 <sup>n.s</sup>	
 <p>4,6-dimetil-2-(piridin-2-il) quinolina <b>17</b></p>	Control negativo	1,00 ± 0,08	1,00 ± 0,17
	Control positivo 1	13,90 ± 1,53 <sup>*</sup>	-
	Control positivo 2	-	3,20 ± 0,81 <sup>*</sup>
	0.13 µM	1,08 ± 0,21 <sup>n.s</sup>	0,67 ± 0,22 <sup>n.s</sup>
	0.27 µM	1,10 ± 0,21 <sup>n.s</sup>	0,75 ± 0,13 <sup>n.s</sup>
	0.55 µM	1,06 ± 0,18 <sup>n.s</sup>	0,66 ± 0,10 <sup>n.s</sup>
	1.1 µM	0,95 ± 0,10 <sup>n.s</sup>	0,75 ± 0,18 <sup>n.s</sup>
	2.2 µM	0,99 ± 0,13 <sup>n.s</sup>	0,79 ± 0,19 <sup>n.s</sup>
	4.4 µM	0,91 ± 0,15 <sup>n.s</sup>	0,92 ± 0,20 <sup>n.s</sup>
	8.8 µM	0,92 ± 0,11 <sup>n.s</sup>	1,04 ± 0,16 <sup>n.s</sup>
	17.6 µM	1,10 ± 0,15 <sup>n.s</sup>	0,65 ± 0,14 <sup>n.s</sup>
	35.2 µM	1,13 ± 0,14 <sup>n.s</sup>	0,60 ± 0,26 <sup>n.s</sup>
	70.5 µM	1,11 ± 0,03 <sup>n.s</sup>	0,60 ± 0,19 <sup>n.s</sup>
	141µM	1,02 ± 0,19 <sup>n.s</sup>	0,60 ± 0,22 <sup>n.s</sup>
282 µM	1,09 ± 0,19 <sup>n.s</sup>	0,46 ± 0,11 <sup>n.s</sup>	

Tabla 4. (Continuación)

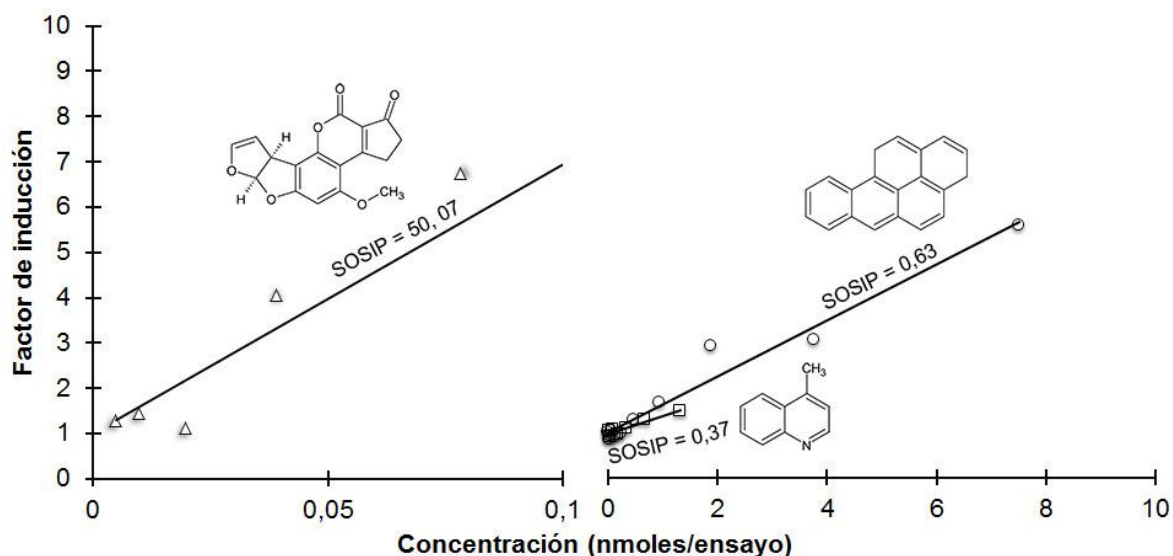
Compuestos	Tratamientos	FI (Con S9)	FI (Sin S9) <sup>†</sup>
 <p>4,6-dimetil-5-nitro-2-(piridinil) quinolina <b>18</b></p>	Control negativo	1,00 ± 0,13	1,00 ± 0,16
	Control positivo 1	10,43 ± 1,43	-
	Control positivo 2	-	4,46 ± 1,35
	0.13 µM	1,22 ± 0,23 <sup>n.s</sup>	0,82 ± 0,12 <sup>n.s</sup>
	0.27 µM	1,42 ± 0,30 <sup>n.s</sup>	0,93 ± 0,15 <sup>n.s</sup>
	0.55 µM	1,17 ± 0,19 <sup>n.s</sup>	0,94 ± 0,14 <sup>n.s</sup>
	1.1 µM	1,02 ± 0,23 <sup>n.s</sup>	1,00 ± 0,22 <sup>n.s</sup>
	2.2 µM	0,90 ± 0,20 <sup>n.s</sup>	1,17 ± 0,22 <sup>n.s</sup>
	4.4 µM	0,74 ± 0,12 <sup>n.s</sup>	1,03 ± 0,17 <sup>n.s</sup>
	8.8 µM	0,75 ± 0,12 <sup>n.s</sup>	0,95 ± 0,19 <sup>n.s</sup>
	17.6 µM	0,91 ± 0,07 <sup>n.s</sup>	1,02 ± 0,25 <sup>n.s</sup>
	35.2 µM	0,75 ± 0,12 <sup>n.s</sup>	0,84 ± 0,14 <sup>n.s</sup>
	70.5 µM	1,05 ± 0,21 <sup>n.s</sup>	1,07 ± 0,30 <sup>n.s</sup>
	141 µM	1,05 ± 0,26 <sup>n.s</sup>	0,69 ± 0,09 <sup>n.s</sup>
282 µM	0,88 ± 0,18 <sup>n.s</sup>	1,10 ± 0,33 <sup>n.s</sup>	
 <p>8-isopropil-4-metil- 2-(piridinil)quinolina <b>19</b></p>	Control negativo	1,00 ± 0,16	1,00 ± 0,14
	Control positivo 1	12,97 ± 2,05*	-
	Control positivo 2	-	3,44 ± 0,93*
	0.13 µM	1,02 ± 0,16 <sup>n.s</sup>	0,71 ± 0,14 <sup>n.s</sup>
	0.27 µM	1,14 ± 0,15 <sup>n.s</sup>	0,78 ± 0,13 <sup>n.s</sup>
	0.55 µM	1,03 ± 0,18 <sup>n.s</sup>	0,63 ± 0,08 <sup>n.s</sup>
	1.1 µM	0,90 ± 0,08 <sup>n.s</sup>	0,66 ± 0,05 <sup>n.s</sup>
	2.2 µM	0,99 ± 0,18 <sup>n.s</sup>	0,86 ± 0,16 <sup>n.s</sup>
	4.4 µM	0,99 ± 0,19 <sup>n.s</sup>	0,96 ± 0,19 <sup>n.s</sup>
	8.8 µM	0,79 ± 0,15 <sup>n.s</sup>	0,79 ± 0,15 <sup>n.s</sup>
	17.6 µM	0,93 ± 0,13 <sup>n.s</sup>	0,99 ± 0,20 <sup>n.s</sup>
	35.2 µM	0,92 ± 0,19 <sup>n.s</sup>	0,88 ± 0,14 <sup>n.s</sup>
	70.5 µM	0,91 ± 0,09 <sup>n.s</sup>	1,05 ± 0,27 <sup>n.s</sup>
	141 µM	0,82 ± 0,06 <sup>n.s</sup>	0,80 ± 0,24 <sup>n.s</sup>
282 µM	0,79 ± 0,05 <sup>n.s</sup>	0,57 ± 0,10 <sup>n.s</sup>	

**FI:** Valores promedios del Factor de Inducción calculados a partir de un mínimo de tres experimentos independientes con cuatro replicas cada uno y sus correspondientes errores estándar. Como control negativo se usó agua destilada. Como control positivo 1 se usó el 4-NQO y como control positivo 2 se usó el B[a]P. \*: Diferencia significativa ( $p < 0.05$  usando test de Dunnet) respecto al control negativo. **n.s.:** No se encontró diferencia significativa.

Los valores de FI para el compuesto 4-metilquinolina (**11**) mostraron un significativo incremento respecto al control negativo ( $p < 0,05$ ) a partir de una dosis de 8,8  $\mu\text{M}$  alcanzando un valor máximo (FI = 1,61) a una dosis de 141  $\mu\text{M}$ . Para dicho rango, se encontró una moderada pero significativa correlación dosis-respuesta ( $R = 0,48$ ;  $p < 0,05$ ); sugiriendo que la 4-metilquinolina tiene baja genotoxicidad en el SOS Chromotest.

Estos argumentos son soportados por el valor de su Potencia de Inducción SOS (SOSIP), el cual representa el Factor de Inducción por unidad de masa (nanomol) del compuesto ensayado (Quillardet y Hofnung, 1985). Este índice es determinado a partir de la pendiente de la región lineal de la curva dosis-respuesta como la razón entre el Factor de Inducción versus la concentración, para un rango de dosis dado (ver acápite 2.4.3). La Figura 11 presenta los valores de SOSIP de tres compuestos: 4-metilquinolina, B[a]P y AFB1; los cuales presentan un mecanismo genotóxico común caracterizado por la formación de epóxidos que reaccionan con el ADN. Los resultados mostraron que el valor de SOSIP dependió del tamaño del compuesto como sigue: Aflatoxina B1 > Benzo[a]pireno > 4-metilquinolina.

Figura 11. Potencia de inducción de la respuesta SOS en 4-metilquinolina y mutágenos de referencia



Por su parte, ninguna de las 4-metilquinolinas sustituidas (**12-19**) aquí estudiadas indujo daño genético en el modelo biológico usado. La incorporación del grupo piridilo sobre la posición C-2 del anillo piridina de la 4-metilquinolina (**12**), reduce la genotoxicidad de la 4-metilquinolina a valores de FI próximos o por debajo de la unidad. Adicionalmente, la incorporación de átomos halógenos y grupos metilos en la posición C-6 (**14-18**) o de átomos halogenados e isopropilo en la posición C-8 del anillo benceno de la 4-metil-2-(piridil)quinolina (**14**, **19**); tampoco afectó significativamente el patrón de genotoxicidad de éste último compuesto. Aunque esta serie de moléculas, presentó limitaciones para un estudio detallado de relación estructura-actividad (dado por la baja genotoxicidad del compuesto de referencia estructural, 4-metilquinolina); es claro que ninguna de las 4-metil-2-(piridil)quinolinas estudiadas es genotóxica en el modelo experimental usado. El Anexo C muestra la cinética de inducción producto del tratamiento con estos

compuestos en el SOS chromotest, las cuales pueden ser comparadas con la del mutágeno de referencia (B[a]P) usado para ensayos con activación metabólica.

### **3.4 GENOTOXICIDAD DE LAS QUINOLINAS BASADAS EN LA ESTRUCTURA DEL 4-NITROQUINOLIN-1-ÓXIDO**

Como se indicó en el acápite anterior, la serie de las 4-metil-2-(pirinidil)quinolinas estudiadas no resultó adecuada para análisis de relación estructura-actividad genotóxica de estas quinolinas. Por ello, en el presente estudio se prepararon y se ensayaron nuevos derivados estructurales de un compuesto quinolínico altamente mutagénico, el 4-NQO. Se conoce que el mecanismo genotóxico del 4-NQO se caracteriza por la reducción enzimática del grupo nitro (NO<sub>2</sub>) de su anillo piridínico que resulta en la formación de 4-N-hidroxi-aminoquinolin-1-óxido (4HAQO), el cual a su vez es modificada enzimáticamente a seril-4-hidroxi-aminoquinolin-1-óxido (seril-4HAQO); un compuesto altamente reactivo que forma aductos de quinolinas en el ADN (ver detalles en el acápite 1.4.3). El 4-NQO es un inductor directo de la respuesta SOS en *Escherichia coli*, quien contiene todas las enzimas involucradas en la activación enzimática del 4-NQO; por lo tanto, los ensayos no requieren adición de sistemas exógenos de activación metabólica (Fracción S9 de hígado de rata).

Los valores promedio de FI y sus respectivos errores estándar para los ensayos de genotoxicidad de análogos estructurales del 4-NQO, son mostrados en la Tabla 5. La cinética de inducción del gen *sulA* por tratamiento con estos compuestos es además mostrada en el Anexo D.

Tabla 5. Valores promedios de Factor de Inducción SOS (FI) obtenidos para quinolinas basadas en la estructura del 4-nitroquinolin-1-óxido usando el SOS Chromotest

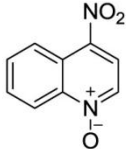
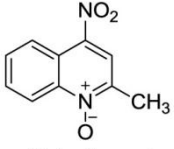
Compuestos	Tratamientos	FI (Sin S9)
 <p>4-nitroquinolin-1-óxido <b>20</b></p>	Control negativo	1,00 ± 0,08
	Control positivo	24,16 ± 2,14*
	0.13 µM	16,62 ± 1,86*
	0.27 µM	33,91 ± 2,83*
	0.55 µM	32,24 ± 2,92*
	1.1 µM	28,98 ± 3,22*
	2.2 µM	11,79 ± 1,82*
	4.4 µM	2,97 ± 0,70*
	8.8 µM	0,93 ± 0,35 <sup>n.s</sup>
	17.6 µM	0,55 ± 0,05 <sup>n.s</sup>
	35.2 µM	0,43 ± 0,07 <sup>n.s</sup>
	70.5 µM	0,25 ± 0,02 <sup>n.s</sup>
	141 µM	0,17 ± 0,01 <sup>n.s</sup>
282 µM	0,13 ± 0,01 <sup>n.s</sup>	
		SOSIP=796,77
 <p>2-metil-4-nitroquinolin-1-óxido <b>21</b></p>	Control negativo	1,00 ± 0,07
	Control positivo	16,30 ± 3,53*
	0.03 µM	0,78 ± 0,08 <sup>n.s</sup>
	0.06 µM	0,75 ± 0,13 <sup>n.s</sup>
	0.13 µM	0,83 ± 0,16 <sup>n.s</sup>
	0.27 µM	0,96 ± 0,08 <sup>n.s</sup>
	0.55 µM	0,89 ± 0,12 <sup>n.s</sup>
	1.1 µM	1,07 ± 0,18 <sup>n.s</sup>
	2.2 µM	1,36 ± 0,15 <sup>n.s</sup>
	4.4 µM	1,58 ± 0,16 <sup>n.s</sup>
	8.8 µM	2,85 ± 0,33*
	17.6 µM	5,25 ± 0,46*
	35.2 µM	11,89 ± 0,29*
70.5 µM	18,95 ± 0,97*	
141 µM	42,65 ± 1,20*	
282 µM	35,06 ± 2,13*	
		SOSIP=1,94

Tabla 5. (Continuación)

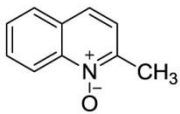
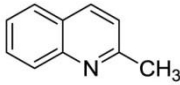
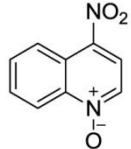
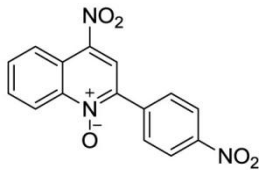
Compuestos	Tratamientos	FI (Sin S9)
 <p>2-metilquinolin-1-óxido <b>22</b></p>	Control negativo	1,00 ± 0,09
	Control positivo	9,84 ± 3,50*
	0.03 µM	0,97 ± 0,13 <sup>n.s</sup>
	0.06 µM	1,03 ± 0,15 <sup>n.s</sup>
	0.13 µM	0,95 ± 0,08 <sup>n.s</sup>
	0.27 µM	0,96 ± 0,13 <sup>n.s</sup>
	0.55 µM	0,71 ± 0,14 <sup>n.s</sup>
	1.1 µM	0,90 ± 0,13 <sup>n.s</sup>
	2.2 µM	1,06 ± 0,11 <sup>n.s</sup>
	4.4 µM	0,80 ± 0,06 <sup>n.s</sup>
	8.8 µM	0,83 ± 0,10 <sup>n.s</sup>
	17.6 µM	0,97 ± 0,04 <sup>n.s</sup>
	35.2 µM	0,91 ± 0,11 <sup>n.s</sup>
	70.5 µM	1,24 ± 0,16 <sup>n.s</sup>
141 µM	1,02 ± 0,16 <sup>n.s</sup>	
282 µM	1,08 ± 0,16 <sup>n.s</sup>	
 <p>2-metilquinolina <b>23</b></p>	Control negativo	1,00 ± 0,16
	Control positivo	3,00 ± 0,05*
	0.03 µM	0,91 ± 0,17 <sup>n.s</sup>
	0.06 µM	0,96 ± 0,20 <sup>n.s</sup>
	0.13 µM	0,89 ± 0,16 <sup>n.s</sup>
	0.27 µM	0,94 ± 0,23 <sup>n.s</sup>
	0.55 µM	0,85 ± 0,19 <sup>n.s</sup>
	1.1 µM	1,00 ± 0,21 <sup>n.s</sup>
	2.2 µM	0,90 ± 0,18 <sup>n.s</sup>
	4.4 µM	1,03 ± 0,07 <sup>n.s</sup>
	8.8 µM	0,87 ± 0,17 <sup>n.s</sup>
	17.6 µM	1,02 ± 0,19 <sup>n.s</sup>
	35.2 µM	0,84 ± 0,16 <sup>n.s</sup>
	70.5 µM	1,01 ± 0,23 <sup>n.s</sup>
141 µM	0,84 ± 0,40 <sup>n.s</sup>	
282 µM	0,67 ± 0,27 <sup>n.s</sup>	

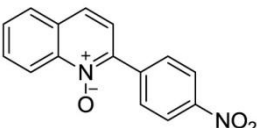
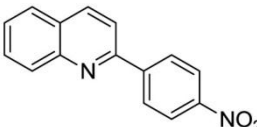
Tabla 5. (Continuación)

Compuestos	Tratamientos	FI (Sin S9)
 <p>4-nitroquinolin-1-óxido <b>20</b></p>	Control negativo	1,00 ± 0,08
	Control positivo	24,16 ± 2,14*
	0.13 µM	16,62 ± 1,86*
	0.27 µM	33,91 ± 2,83*
	0.55 µM	32,24 ± 2,92*
	1.1 µM	28,98 ± 3,22*
	2.2 µM	11,79 ± 1,82*
	4.4 µM	2,97 ± 0,70*
	8.8 µM	0,93 ± 0,35 <sup>n.s</sup>
	17.6 µM	0,55 ± 0,05 <sup>n.s</sup>
	35.2 µM	0,43 ± 0,07 <sup>n.s</sup>
	70.5 µM	0,25 ± 0,02 <sup>n.s</sup>
	141 µM	0,17 ± 0,01 <sup>n.s</sup>
282 µM	0,13 ± 0,01 <sup>n.s</sup>	
 <p>4-nitro-2-(4-nitrofenil) quinolin-1-óxido <b>24</b></p>	Control negativo	1,00 ± 0,13
	Control positivo	34,4 ± 13,3*
	0.03 µM	1,21 ± 0,20 <sup>n.s</sup>
	0.06 µM	0,96 ± 0,12 <sup>n.s</sup>
	0.13 µM	1,04 ± 0,21 <sup>n.s</sup>
	0.27 µM	1,12 ± 0,16 <sup>n.s</sup>
	0.55 µM	1,23 ± 0,23 <sup>n.s</sup>
	1.1 µM	1,79 ± 0,29*
	2.2 µM	2,44 ± 0,48*
	4.4 µM	3,43 ± 0,64*
	8.8 µM	4,06 ± 1,17*
	17.6 µM	8,97 ± 0,49*
	35.2 µM	12,16 ± 1,25*
70.5 µM	10,42 ± 1,50*	
141 µM	9,34 ± 1,87*	
282 µM	2,47 ± 0,62*	

SOSIP=796,77

SOSIP=2,22

Tabla 5. (Continuación)

Compuestos	Tratamientos	FI (Sin S9)
 <p>2-(4-nitrofenil)quinolin-1-óxido <b>25</b></p>	Control negativo	1,00 ± 0,13
	Control positivo	26,2 ± 5,2*
	0.03 µM	0,86 ± 0,15 <sup>n.s</sup>
	0.06 µM	0,93 ± 0,12 <sup>n.s</sup>
	0.13 µM	0,83 ± 0,06 <sup>n.s</sup>
	0.27 µM	0,85 ± 0,11 <sup>n.s</sup>
	0.55 µM	0,83 ± 0,15 <sup>n.s</sup>
	1.1 µM	0,77 ± 0,10 <sup>n.s</sup>
	2.2 µM	0,71 ± 0,14 <sup>n.s</sup>
	4.4 µM	0,82 ± 0,12 <sup>n.s</sup>
	8.8 µM	1,15 ± 0,08 <sup>n.s</sup>
	17.6 µM	1,00 ± 0,16 <sup>n.s</sup>
	35.2 µM	1,01 ± 0,16 <sup>n.s</sup>
	70.5 µM	1,13 ± 0,18 <sup>n.s</sup>
141 µM	1,12 ± 0,19 <sup>n.s</sup>	
282 µM	1,06 ± 0,14 <sup>n.s</sup>	
 <p>2-(4-nitrofenil)quinolina <b>26</b></p>	Control negativo	1,00 ± 0,13
	Control positivo	19,2 ± 3,4*
	0.03 µM	0,77 ± 0,13 <sup>n.s</sup>
	0.06 µM	0,78 ± 0,08 <sup>n.s</sup>
	0.13 µM	0,94 ± 0,13 <sup>n.s</sup>
	0.27 µM	0,87 ± 0,12 <sup>n.s</sup>
	0.55 µM	0,91 ± 0,17 <sup>n.s</sup>
	1.1 µM	0,82 ± 0,17 <sup>n.s</sup>
	2.2 µM	0,80 ± 0,10 <sup>n.s</sup>
	4.4 µM	0,75 ± 0,13 <sup>n.s</sup>
	8.8 µM	0,90 ± 0,21 <sup>n.s</sup>
	17.6 µM	0,67 ± 0,11 <sup>n.s</sup>
	35.2 µM	0,81 ± 0,08 <sup>n.s</sup>
	70.5 µM	0,99 ± 0,26 <sup>n.s</sup>
141 µM	0,67 ± 0,15 <sup>n.s</sup>	
282 µM	0,93 ± 0,29 <sup>n.s</sup>	

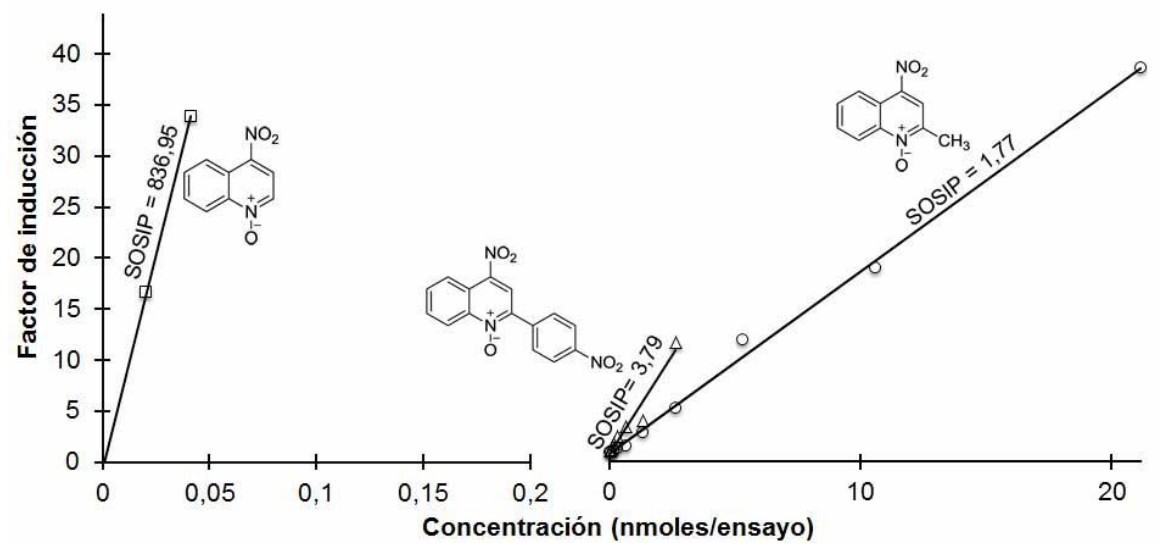
FI: Valores promedios del Factor de Inducción calculados a partir de un mínimo de tres experimentos independientes con cuatro replicas cada uno y sus correspondientes errores estándar. Como control negativo se usó agua destilada. Como control positivo se usó el 4-NQO. \*: Diferencia significativa ( $p < 0.05$  usando test de Dunnet) respecto al control negativo. **n.s.**: No se encontró diferencia significativa.

Los resultados ratifican la importancia del grupo nitro (NO<sub>2</sub>) de la posición C-4 del anillo quinolínico N-oxidado para la genotoxicidad de los 4-nitroquinolin-1-óxidos C2-sustituidos. La ausencia del grupo nitro (NO<sub>2</sub>) en la posición C-4 del anillo quinolínico de sus estructuras químicas (ej: **22** y **25**), reducen totalmente la genotoxicidad de estos derivados. Adicionalmente, se pudo constatar que la N-oxidación del anillo quinolínico (la presencia del grupo 1-óxido), por sí solo, no aporta efecto genotóxico en este tipo de compuesto, como se evidencia de la comparación de los análogos estructurales: **22** y **23**, **25** y **26**.

De acuerdo a los resultados obtenidos, la incorporación de ambos grupos (metilo y 4-nitrofenilo) en la posición C-2 del anillo quinolínico del 4-NQO, reduce significativamente la potencia genotóxica de este compuesto. Como se puede constatar, tanto el **21** como el **24** muestran incrementos significativos en la inducción del gen *sulA* solo a partir de las dosis 8,8 y 1,1 µM, respectivamente; valores de dosis muy superiores al observado para el 4-NQO (0,13 µM). Estos compuestos mostraron un máximo nivel de inducción a dosis de 141 µM (FI = 42,6) y 35,2 µM (FI= 12,16), respectivamente.

En la Figura 12, se muestran los valores de Potencia de Inducción SOS (SOSIP) de los tres compuestos que resultaron positivos para la inducción de la respuesta SOS: 4-NQO (**20**), **21** y **24**. Como se puede constatar, el valor de SOSIP resultó en el siguiente orden: 4-NQO (836,95) > **24** (3,79) > **21** (1,77). Es decir, la introducción de grupos 4-nitrofenilo y metilo en la posición C-2 del anillo quinolínico del 4-NQO redujo en 221 y 472 veces la potencia mutagénica de este compuesto.

Figura 12. Potencia de inducción de la respuesta SOS en quinolinas basadas en la estructura del 4-nitroquinolin-1-óxido



#### 4. DISCUSIÓN

Existe creciente interés por los compuestos quinolínicos dado su amplio potencial terapéutico (agentes antiparasitarios, antibacterianos, anticancerígenos, antivirales etc.). El presente trabajo, aporta nueva información sobre la genotoxicidad de las quinolinas polifuncionadas y sobre la relación estructura-actividad basada en la incorporación de sustituyentes en posiciones específicas de sus estructuras químicas, que nos permiten reducir sus propiedades carcinogénicas; ampliando así su potencial terapéutico.

Para facilitar la discusión, se han dividido los 26 compuestos estudiados en dos grandes grupos basado en sus mecanismos genotóxicos. El primer grupo (**1-19**), son aquellos compuestos quinolínicos cuya genotoxicidad depende de la formación de una enamina epóxido (C2-C3) en la parte piridinica del anillo quinolínico de su estructura; proceso que es mediado por enzimas hepáticas de la familia Citocromo P450 (Tada *et al.*, 1982; Saeki *et al.*, 1993, Reigh *et al.*, 1996; Hirano *et al.*, 2002). La transformación por enzimas hepáticas de la quinolina a enamina epóxido (C2-C3) produce aductos de guanina (G) y citosina (C) que conducen a errores de apareamiento entre bases; generando así transversiones del tipo G→T o G→C (Suzuki *et al.*, 1998, 2000) que inician diferentes tipos de carcinomas hepáticos en mamíferos (Hirao *et al.*, 1976; Futakuchi *et al.*, 1996; Saeki *et al.*, 1997a).

La detección del daño genético inducido por este tipo de compuestos en modelos bacterianos (Ej: *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium*) requiere el uso de sistemas exógenos de activación metabólica con las mencionadas enzimas (Ej: fracción S9 de hígado de ratas); dado que ellos no las producen (ver Callen, 1978). Bajo tales condiciones de activación metabólica, compuestos que pueden ser transformado enzimáticamente a enaminas epóxidos (C2-C3) como la

quinolina (1), la 8-hidroxiquinolina (2) y la 4,7-dicloroquinolina (3), no indujeron daño genético en el SOS Chromotest (Tablas 3 y 4); solo la 4-metilquinolina (11) mostró un leve efecto genotóxico. Por su parte, ninguna de las 2-fenilquinolinas halogenadas (4-6), de las 2-(3,4-metilendioxfenil)quinolinas (7-10) o de las 4-metil-2-(piridil)quinolinas (12-19) resultaron genotóxicas; soportando la importancia de la posición C-2 para la genotoxicidad de este tipo de compuestos. Estos hallazgos, soportan previos estudios que mostraron similares resultados estudiando quinolinas halogenadas (Takahashi *et al.*, 1988; LaVoie *et al.*, 1991).

La baja genotoxicidad aquí encontrada para la quinolina (1), la 4-metilquinolina (11), así como para su derivado halogenado 4,7-dicloroquinolina (3), contrasta con lo observado en previos trabajos que estudiaron la mutagenicidad de estos compuestos mediante el ensayo de reversión génica en *Salmonella typhimurium* (Takahashi *et al.*, 1988; Saeki *et al.*, 1996, 1997a, Kato *et al.*, 1999, 2000). El hecho de que estos dos ensayos respondan de manera diferentes durante la detección del daño (Rosenkranz *et al.*, 1999), podría explicar las diferencias en los resultados. El ensayo de reversión génica en *Salmonella typhimurium* detecta mutaciones puntuales en un gen de la síntesis de la histidina, mientras que el SOS Chromotest daños genéticos capaces de inducir la respuesta SOS en *Escherichia coli*.

Se ha indicado, que los aductos de quinolinas conducen a errores de apareamiento entre bases del ADN (Suzuki *et al.*, 1998, 2000). Este tipo de daño, no distorsiona suficientemente la hélice del ADN como para provocar su reconocimiento por sistemas de reparación por escisión, que conduzcan a la formación de regiones de simple cadena de ADN inductoras de la respuesta SOS (Salles y Defais, 1984, Higashitani *et al.*, 1992). Para validar esta hipótesis, aquí se compara la potencia de inducción SOS (SOSIP) de tres compuestos cuyos aductos provocan diferentes niveles de distorsión estructural en el ADN: la 4-metilquinolina, el benzo[a]pireno y la aflatoxina B1. Los resultados mostraron

(Figura 11), que el valor de SOSIP dependió de la masa atómica o peso molecular del compuesto, aflatoxina B1 (ma=312,27g/mol) > benzo[a]pireno (ma=252,3g/mol)> 4-metilquinolina (143,19g/mol), validando la hipótesis anterior y explicando los bajos niveles de genotoxicidad observados para la 4-metilquinolina al ser evaluada con el SOS chromotest.

El segundo grupo (**20-26**), son aquellos compuestos quinolónicos cuya genotoxicidad depende de la reducción de un grupo nitro (NO<sub>2</sub>) en la posición C4 del anillo piridina de su estructura, mediante actividad nitrorreductasas (Okabayashi y Yoshimoto, 1962). El compuesto tipo es el 4-NQO, un potente carcinógeno en mamíferos (Bailleul *et al.*, 1989). Se conoce, que la reducción enzimática del grupo nitro (NO<sub>2</sub>) de su anillo piridina resulta en la formación de 4-N-hidroxilaminoquinolin-1-óxido (4HAQO), la cual a su vez es modificada enzimáticamente a seril-4-hidroaminoquinolin-1-óxido (seril-4HAQO); un compuesto altamente reactivo con el ADN que forma aductos de adenina y guanina responsables de su genotoxicidad (Araki *et al.*, 1970; Tada y Tada, 1975; Galiégue-Zouitina *et al.*, 1985, 1986; Kohda *et al.*, 1991). Adicionalmente, el 4-NQO forma 8-hidroxidesoxiguaninas (8OHdG) en el ADN a través de un mecanismo que involucra especies reactivas del oxígeno (Blaglow *et al.*, 1977; Arima *et al.*, 2006).

La detección del daño genético inducido por este tipo de compuestos en modelos bacterianos no requiere del uso de sistemas exógenos de activación metabólica como el caso anterior. En este caso, las células de *Escherichia coli* reducen enzimáticamente el 4-NQO produciendo aductos de guanina, principalmente 3-(deoxiguanisin-*N*<sup>2</sup>-yl)-4-aminoquinolin-1-óxido, que resultan en sitiosapurínicos/apirimidínicos y roturas en el ADN; las cuales por actividad exonucleasa terminan produciendo regiones de cadena simple de ADN que inducen la respuesta SOS (Galiegue-Zouitina *et al.*, 1989; Menichini *et al.*, 1989; Panigrahi y Walker, 1991; Daubersies *et al.*, 1992; Ruiz-Laguna *et al.*, 1994).

Los resultados presentados en la Tabla 5 indican que los nitroquinolin-1-óxidos aquí estudiados son potentes inductores de la respuesta SOS en *E. coli*; y por ende, que el ensayo SOS chromotest puede ser de utilidad en estudios de relación estructura-actividad de este tipo de compuestos. En tal sentido, se pudo constatar la importancia del grupo nitro (NO<sub>2</sub>) en la posición C-4 del 4-NQO para la genotoxicidad de este tipo de compuestos como ha sido previamente indicado por otros autores (Araki *et al.*, 1970; Paul *et al.*, 1971); de manera que solo los análogos estructurales que contienen este grupo inducen la respuesta SOS en *E. coli* PQ37.

Adicionalmente, la significativa reducción del valor SOSIP del 4-NQO con la incorporación de grupos metilo y 4-nitrofenilo en la posición C-2 del anillo quinolínico (**21** y **24**, respectivamente); indica la importancia de este carbono para la formación del intermediario reactivo con el ADN durante la nitroreducción. Paul *et al.* (1971) mostraron que la incorporación de grupos metilo y etilo en la posición C-2 de la parte piridínica del 4-NQO (2-metil-4-nitroquinolin-1-óxido y 2-etil-4-nitroquinolin-1-óxido, respectivamente) reduce solo levemente la carcinogénesis inducida por este compuesto en ratón. Sin embargo, la incorporación del grupo butilo en la posición C-2, o de grupos etilo y metilo en las posiciones C-2 y C-3, respectivamente (2-etil-3-metil-4-nitroquinolin-1-óxido); elimina el efecto carcinogénico.

Se cree que la pérdida de la carcinogénesis del 4-NQO por incorporación de grupos sustituyentes en el carbono C-2 del anillo piridínico del esqueleto de quinolina, se debe a que ésta impide la formación de puentes de hidrógenos entre el oxígeno del grupo N-óxido y el hidrógeno del grupo amino de la desoxiguanosina; el cual estabiliza el complejo 4HAQO-ADN (Paul *et al.*, 1971; Bailleul *et al.*, 1989). El hecho de que la incorporación de los grupos metilos y 4-nitrofenilo en la posición C-2 de la parte piridínica del 4-NQO no reducen su genotoxicidad en la misma medida (Figura 12), sugiere que el tipo de sustituyente,

y no solo interferencia estructural de éstos, es importante para la reducción de la genotoxicidad de este tipo de compuestos.

## 5. CONCLUSIONES

- Las quinolinas cuyo mecanismo de genotoxicidad es mediado por la formación de una enamina epóxido (Ej: 2-fenilquinolinas, 2-(3,4-metilendioxfenil)quinolinas, 2-(4-nitrofenil)quinolinas y 4-metil-2-(piridil)quinolinas) son pobres inductores de la respuesta SOS en *E. coli*; por tanto, resultaron inocuas en el modelo experimental usado. Solo la 4-metilquinolina, resultó levemente mutagénica.
- Las quinolinas cuyo mecanismo de genotoxicidad es mediado por la reducción del grupo nitro (NO<sub>2</sub>) en la posición C-4 (Ej: 4-nitroquinolin-1-óxidos) son fuertes inductores de la respuesta SOS en *E. coli*; por tanto, son considerados genotóxicas en el modelo experimental usado.
- La incorporación del grupos sustituyentes en la posición C-2 del anillo quinolínico de todos los tipos de quinolinas estudiados (quinolinas, 4-metilquinolinas y 4-nitroquinolina-1-óxidos), afecta la potencia genotóxica del compuesto en cuestión; siendo particularmente evidente en las 4-metilquinolinas y los 4-nitroquinolin-1-óxidos.
- La incorporación de grupos sustituyentes en el anillo bencénico de 2-fenilquinolinas, de 2-(3,4-metilendioxfenil)quinolinas y de 4-metil-2-(piridil)quinolinas, no modifican significativamente su genotoxicidad.

- El ensayo SOS Chromotest resultó sensible para el estudio de relación estructura-genotoxicidad, especialmente, para compuestos cuyo mecanismo de genotoxicidad es mediado por la reducción del grupo nitro (NO<sub>2</sub>) en la posición C-4 de la quinolina.

## 6. RECOMENDACIONES

- Se recomienda el ensayo SOS Chromotest para estudios de relación estructura-genotoxicidad de compuestos quinolínicos cuyo mecanismo de genotoxicidad es mediado por la reducción del grupo nitro ( $\text{NO}_2$ ) en la posición C-4 de la quinolina.
- Estudiar los compuestos quinolínicos que aquí resultaron inocuos usando sistemas de activación metabólica de humanos, con el fin de ampliar el conocimiento existente sobre las rutas de activación metabólicas de estos compuestos.

## BIBLIOGRAFÍA

Al-Khalil S, Alkofahi A, El-Eisawi D, Al-Shibib A. 1998. Transthorine, a new quinoline alkaloid from *Ephedra transitoria*. *Journal of Natural Products*. 61(2):262-263.

Araki M, Matsushima T, Sugimura T. 1971. Relation between carcinogenicity and metabolic reduction of 4-nitroquinoline 1-oxide derivatives. *Cellular and molecular life sciences* 26(5): 528-529.

Arima Y, Nishigori C, Takeuchi T, Oka S, Morimoto K, Utani A, Miyachi Y. 2006. 4-nitroquinoline 1-oxide forms 8-hydroxydeoxyguanosine in human fibroblasts through reactive oxygen species. *Toxicological sciences* 91(2):382–392.

Bailleul B, Galiègue S, Loucheux-Lefebvre MH. 1981. Adducts from the reaction of O,O'-diacetyl or O-acetyl 1-oxide with purine nucleosides derivatives of the carcinogen 4-hydroxyaminoquinoline 1-oxide with purine nucleosides. *Cancer Research* 41(11):4559-4565.

Bailleul B, Daubersies P, Galiègue-Zouitina S, Loucheux-Lefebvre MH. 1989. Molecular basis of 4-nitroquinoline 1-oxide carcinogenesis. *Japanese Journal of Cancer Research* 80(8): 691-697.

Blaglow JE, Jacobson BE, Nygaard OF. 1977. Metabolic reduction of 4-nitroquinoline *N*-oxide and other radical-producing drugs to oxygen-reactive intermediates. *Cancer Research* 37(9):3306-3313.

Borgerding MF, Bodnar JA, Chung HL, Mangan PP, Morrison CC, Risner CH, Rogers JC, Simmons DF, Uhrig MS, Wendelboe FN, Wingate DE, Winkler LS. 1997. Chemical and Biological Studies of a New Cigarette that Primarily Heats Tobacco. Part 1. Chemical Composition of Mainstream Smoke. *Food and Chemical Toxicology* 36(3): 169-182.

Buening MK, Wislocki PG, Levin W, Yagi H, Thakker DR, Akagi H, Koreeda M, Jerina DM, Conney AH. 1978. Tumorigenicity of the optical enantiomers of the diastereomeric benzo[a]pyrene 7,8-diol-9,10-epoxides in newborn mice: Exceptional activity of (+)-7 $\beta$ ,8 $\alpha$ -dihydroxy-9 $\alpha$ ,10 $\alpha$ epoxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo[a]pyrene. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 75(11): 5358-5361.

Buller R, Peterson M, Almarsson Ö, Leiserowitz L. 2002. Quinoline binding site on Malaria pigment crystal: A rational pathway for Antimalaria drug design. *Crystal Growth & Design* 2(6):553-562.

Callen DF. 1978. A review of the metabolism of xenobiotics by microorganisms with relation to short-term test systems for environmental carcinogens. *Mutation Research* 55 (3-4)153-163.

Conney AH, Miller EC, Miller JA. 1957. Substrate-induced synthesis and other properties of benzpyrene hydroxylase in rat liver. *The Journal of Biological Chemistry* 228(2):753-766.

Couch GD, Burke PJ, Knox RJ, Moody CJ. 2008. Synthesis of 2-aryl-6-methyl-5-nitroquinoline derivatives as potential prodrug systems for reductive activation. *Tetrahedron* 64(12): 2816-2823.

Counts ME, Morton MJ, Laffoon SW, Cox RH, Lipowicz PJ. 2005. Smoke composition and predicting relationships for international commercial cigarettes smoked with three machine-smoking conditions. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 41(3):185–227.

Daubersies P, Galiegue-Zouitina S, Koffel-Schwartz N, Fuchs RPP, Loucheux-Lefebvre MH, Bailleul B. 1992. Mutation spectra of the two guanine adducts of the carcinogen 4-nitroquinoline 1-oxide in *Escherichia coli*. Influence of neighbouring base sequence on mutagenesis. *Carcinogenesis* 13(3):349-354.

Dekker KA, Inagaki T, Gootz TD, Huang LH, Kojima Y, Kohlbrenner WE, Matsunaga Y, McGuirk PR, Nomura E, Sakakibara T, Sakemi S, Suzuki Y, Yamauchi Y, Kojima N. 1998. New quinolone compounds from *Pseudonocardia* sp. with selective and potent anti-*Helicobacter pylori* activity: taxonomy of producing strain, fermentation, isolation, structural elucidation and biological activities. *The Journal of Antibiotics* 51(2):145-52.

Demeunynck M, Tohme N, Lhomme MF, Mellor JM, Lhomme J. 1989. Concerning model metabolites of the carcinogen 4-nitroquinoline 1-oxide. Reactivity of 1-acetoxy-4-(hydroxyimino)-1,4-dihydroquinoline. *The Journal of Organic Chemistry* 54(2):405-410.

Di Fabio R, Tranquillini E, Bertani B, Alvaro G, Micheli F, Sabbatini F, Domenica Pizzi M, Pentassuglia G, Pasquarello A, Messeri T, Donati D, Ratti E, Arban R, Dal Forno G, Reggianiy A, Barnaby RJ. 2003. Enantiomerically pure tetrahydroquinoline derivatives as in vivo potent antagonists of the glycine binding site associated to the NMDA receptor. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 13(21):3863–3866

Egan TJ. 2006. Chloroquine and primaquine: combining old drugs as a new weapon against falciparum malaria?. *TRENDS in Parasitology* 22(6):235-237.

Eisner T, Morgan RC, Attygalle AB, Smedley SR, Herath KB, Meinwald J. 1997. Defensive production of quinoline by a phasmid insect (*Oreophoetes peruana*). *The Journal of Experimental Biology* 200(19):2493-500.

Essigmann JM, Croy RG, Nadzan AM, Busby WF JR., Reinhold VN, Buchi G, Wogan GN. 1997. Structural identification of the major DNA adduct formed by aflatoxin B1 in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 74(5):1870-1874.

Ferrer R, Lobo G, Gamboa N, Rodrigues J, Abramjuk C, Jung K, Lein M, Charris JE. 2009. Synthesis of (7-Chloroquinolin-4-yl) amino]chalcones: Potential Antimalarial and Anticancer Agents. *Scientia Pharmaceutica*. 77(4):725–741

Fuentes JL, Alonso A, Cuétara E, Vernhe M, Alvarez N, Sánchez-Lamar A, Llagostera M. 2006. Usefulness of SOS Chromotest in the study of medicinal plant as radioprotectors. *International Journal of Radiation Biology* 82(5):323-329.

Futakuchi M, Hasegawa R, Yamamoto A, Cui L, Ogiso T, Ito N, Shirai T. 1996. Low susceptibility of the spontaneously hypertensive rat (SHR) to quinoline-induction of hepatic hemangioendothelial sarcomas. *Cancer Letters* 104(1):37-41.

Galiégue-Zouitina S, Bailleul B, Loucheux-Lefebvre MH. 1985. Adducts from in vivo action of the carcinogen 4-hydroxyaminoquinoline 1-oxide in rats and from in vitro reaction of 4-acetoxyaminoquinoline 1-oxide with DNA and polynucleotides. *Cancer Research* 45(2):520-525.

Galiégue-Zouitina S, Bailleul B, Ginot MY, Perly B, Vigny P, Loucheux-Lefebvre MH. 1986. N2-Guanyl and N6-Adenyl arylation of chicken erythrocyte DNA by the ultimate carcinogen of 4-nitroquinoline 1-oxide. *Cancer Research* 46(4):1858-1863.

Galiégue-Zouitina S, Daubersies P, Loucheux-Lefebvre MH, Bailleul B. 1989. Mutagenicity of N2 guanylation is SOS functions dependent and reminiscent of the high mutagenic property of 4NQO. *Carcinogenesis* 10(10):1961-1966.

Gallagher EP, Wienkers LC, Stapleton PL, Kunze KL, Eaton DL. 1994. Role of human microsomal and human complementary DNA-expressed cytochromes P4501A2 and P4503A4 in the bioactivation of aflatoxin B1. *Cancer research* 54(1):101-108.

Gholap AR, Toti KS, Shirazi F, Kumari R, Bhat MK, Deshpande MV, Srinivasan KV. 2007. Synthesis and evaluation of antifungal properties of a series of the novel 2-amino-5-oxo-4-phenyl-5,6,7,8-tetrahydroquinoline-3-carbonitrile and its analogues. *Bioorganic & Medical Chemistry* 15(21):6705-6715.

Glatt H, Piée A, Pauly K, Steinbrecher T, Schrode R, Oesch F, Seidel A. 1991. Fjord- and bay-region diol-epoxides investigated for stability, SOS induction in *Escherichia coli*, and mutagenicity in *Salmonella typhimurium* and mammalian cells. *Cancer Research* 51(6):1659-1667.

Goloubkova TD, Heckler E, Rates SMK, Henriques JAP, Henriques AT. 1998. Inhibition of cytochrome P450-dependent monooxygenases by an alkaloid fraction from *Helietta apiculata* markedly potentiate the hypnotic action of pentobarbital. *Journal of Ethnopharmacology* 60 (2):141-148.

Gómez-Barrio A, Montero-Pereira D, Nogal-Ruiz JJ, Escario JA, Muelas-Serrano S, Kouznetsov VV, Vargas-Méndez LY, Urbina González JM, Ochoa C. 2006. Antiparasitic properties of homoallylamines and related compounds. *Acta Parasitologica* 51(1):73-78.

Hakura A, Kato TA, Kawamura I, Saeki KI. 2007. Modification of mutagenicity by fluorine-substitution on diazachrysene. *Journal of Health Science* 53(3):320-324.

Higashitani N, Higashitani A, Roth A, Horiuchi K. 1992. SOS Induction in *Escherichia coli* by infection with mutant filamentous phage that are defective in initiation of complementary-strand DNA synthesis. *Journal of Bacteriology* 174(5):1612-1618.

Hanelt Sa, Helbig R, Hartmann A, Lang M, Seidel A, Speit G. 1997. A comparative investigation of DNA adducts, DNA strand breaks and gene mutations induced by benzo[a]pyrene and ( $\pm$ )-anti-benzo[a]pyrene-7,8-diol 9,10-oxide in cultured human cells. *Mutation Research* 390(1-2):179–188.

Hecht S. 1999. Tobacco smoke carcinogens and lung cancer. *Journal of the National Cancer Institute* 91(14):1194-1210.

Hirano Y, Uehara M, Saeki KI, Kato TA, Takahashi K, Mizutani T. 2002. The influence of quinolines on coumarin-7-hydroxylation in bovine liver microsomes and human CYP2A6. *Journal of Health Science* 48(2):118-125.

Hirao K, Shinohara Y, Tsuda H, Fukushima S, Takahashi M, Ito N. 1976. Carcinogenic activity of quinoline on rat liver. *Cancer Research* 36(2):329-335.

Hoemann MZ, Xie RL, Rossi RF, Meyer S, Sidhu A, Cuny GD, Hauske JR. 2002. Potent *in vitro* methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* activity of 2-(1*H*-indol-3-

yl)tetrahydroquinoline derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 12(2):129-132.

Jacquemond-Collet I, Benoit-Vical F, Mustofa, Valentin A, Stanislas E, Mallié M, Fouraste I. 2002. Antiplasmodial and cytotoxic activity of galipinine and other tetrahydroquinolines from *Galipeaofficinalis*. *Planta Medica* 68(1):68-69.

Jiang H, Gelhaus SL, Mangal D, Harvey RG, Blair IA, Penning TM. 2007. Metabolism of benzo[a]pyrene in human bronchoalveolar H358 cells using liquid chromatography-mass spectrometry. *Chemical Research Toxicology* 20(9):1331-1341.

Jianlong W, Liping H, Hanchang, S, Yi Q. 2001. Biodegradation of quinoline by gel immobilized *Burkholderia sp.* *Chemosphere* 44(5):1041-1046.

Kato TA, Saeki KI, Kawazoe Y, Hakura A. 1999. Effects of oligofluorine substitution on the mutagenicity of quinoline: a study with twelve fluoroquinoline derivatives. *Mutation Research* 439(2):149-157.

Kato TA, Hakura A, Mizutani T, Saeki KI. 2000. Anti-mutagenic structural modification by fluorine-substitution in highly mutagenic 4-methylquinoline derivatives. *Mutation Research* 465(1-2):173-182.

Kayirere MG, Mahamoud A, Chevalier J, Soyfer JC, Crémieux A, Barbea J. 1998. Synthesis and antibacterial activity of new 4-alkoxy, 4-aminoalkyl and 4-alkylthioquinoline derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry* 33(1): 55-63.

Kensler TW, Roebuck BD, Wogan GN, Groopman JD. 2011. Aflatoxin: A 50-Year Odyssey of Mechanistic and Translational Toxicology. *Toxicological Sciences* 120(1):28-48.

Khan MTH. 2007. Quinoline analogs as antiangiogenic agents and telomerase inhibitors. *Topics in Heterocyclic Chemistry* 11:213-229.

Kohda K, Kawazoe Y, Minoura Y, Tada M. 1991. Separation and identification of *N*<sup>4</sup>-(guanosin-7-yl)-4-aminoquinoline 1-oxide, a novel nucleic acid adduct of carcinogen 4-nitroquinoline 1-oxide. *Carcinogenesis* 12(8):1523-1525.

Kouznetsov VV, Vargas Méndez LY, Meléndez Gómez CM. 2005. Recent Progress in the Synthesis of Quinolines. *Current Organic Chemistry* 9(2):141-161

Kouznetsov VV, Vargas LY, Leal SM, Cruz U, Coronado CA, Meléndez CM, Romero AR, Escobar R. 2007. Target-oriented synthesis of antiparasitic 2-hetaryl substituted quinolines based on Imino Diels-Alder reactions. *Letters in Drug Design & Discovery* 4(4):293-296.

Kozubek S, Ogievetskaya MM, Krasavin EA, Drasil V, Soska J. 1990. Investigation of the SOS response of *Escherichia coli* after  $\gamma$ -irradiation by means of the SOS chromotest. *Mutation Research* 230(1):1-7.

LaVoie EJ, Defauw J, Fealy M, Way BM, McQueen CA. 1991. Genotoxicity of fluoroquinolones and methylquinolones. *Carcinogenesis* 12(2):217-220.

Levin W, Wood AW, Yagiw H, Jerina DM, Conney AH. 1976. ( $\pm$ )-trans-7,8-dihydroxy-7,8-dihydrobenzo[a]pyrene: A potent skin carcinogen when applied topically to mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 73(11):3867-3871.

Li H, Huang H, Zhang X, Luo X, Lin L, Jiang H, Ding J, Hen K, Liu H. 2008. Discovering novel 3-nitroquinolones as a new class of anticancer agents. *Acta Pharmacologica Sinica* 29 (12):1529-1538.

Liu L, Tang XH, Scognamiglio T, Gudas LJ. 2010. Oral carcinogenesis induced by 4-nitroquinoline 1-oxide in lecithin:retinol acyltransferase gene knockout mice. *Journal of Nutritional Biochemistry* 21(10):975-982.

Loza-Mejía MA, Maldonado-Hernández K, Rodríguez-Hernández F, Rodríguez-Sotres R, González-Sánchez I, Quintero A, Solano JD, Lira-Rocha A. 2008. Synthesis, cytotoxic evaluation, and DNA binding of novel thiazolo[5,4-b]quinoline derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 16(3):1142-1149.

Meléndez-Gómez CM, Kouznetsov VV, Sortino MA, Álvarez SL, Zacchino SA. 2008. In vitro antifungal activity of polyfunctionalized 2-(hetero)-arylquinolines prepared through imino Diels-Alder reactions. *Bioorganic & Medical Chemistry* 16(17):7908-7920.

Menichini P, Fronza G, Tornaletti S, Galiegue-Zouitina S, Bailleul B, Loucheux-Lefebvre MH, Abbondandolo A, Pedrini AM. 1989. *In vitro* DNA modification by the ultimate carcinogen of 4-nitroquinoline-1-oxide: influence of superhelicity. *Carcinogenesis* 10(9):1589-1593.

Mersch-Sundermann V, Schneider U, Klopman G, Rosenkranz H S. 1994. SOS induction in *Escherichia coli* and Salmonella mutagenicity: a comparison using 330 compounds. *Mutagenesis* 9(2):205-224.

Mersch-Sundermann V, Klopman G, Rosenkranz H S. 1996. Chemical structure and genotoxicity: studies of the SOS Chromotest. *Mutation Research* 340(2-3):81-91.

Michael JP. 1999. Quinoline, Quinazoline and Acridone alkaloids. *Natural Product Reports* 16(6):697-709.

Miyata Y, Saeki KI, Kawazoe Y, Hayashi M, Sofuni T, Suzuki T. 1998. Antimutagenic structural modification of quinoline assessed by an *in vivo* mutagenesis assay using *lacZ*-transgenic mice. *Mutation Research* 414(1-3):165-169.

Musiol R, Tabak D, Niedbala H, Podeszwa B, Jampilek J, Kralova K, Dohnal J, Finster J, Mencil A, Polanski J. 2008. Investigating biological activity spectrum for novel quinoline analogues: Hydroxyquinolinecarboxamides with photosynthesis-inhibiting activity. *Bioorganic & Medical Chemistry* 16(8):4490-4499.

Nallan L, Bauer KD, Bendale P, Rivas K, Yokoyama K, Horney CP, Pendyala PR, Floyd D, Lombardo LJ, Williams DK, Hamilton A, Sebti S, Windsor WT, Weber PC, Buckner FS, Chakrabarti D, Gelb MH, Van Voorhis WC. 2005. Protein Farnesyltransferase inhibitors exhibit potent antimalarial activity. *Journal of Medical Chemistry* 48(11):3704-3713.

Nandhakumar R, Suresh T, Calistus-Jude AL, Rajesh-Kannan V, Mohan PS. 2007. Synthesis, antimicrobial activities and cytogenetic studies of newer diazepino quinolines derivatives via Vilsmeier-Haack reaction. *European Journal of Medical Chemistry* 42(8):1128-1136.

Neuwoehner J, Reineke AK, Hollender J, Eisentraeger A. 2009. Ecotoxicity of quinoline and hydroxylated derivatives and their occurrence in groundwater of a tar-contaminated field site. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 72(3):819-827.

Ohta T, Nakamura N, Moriya M, Shirasu Y, Kada T. 1984. The SOS-function-inducing activity of chemical mutagens in *Escherichia coli*. *Mutation Research* 131(3-4):101-109.

Okabayashi T, Yoshimoto A. 1962. Reduction of 4-nitroquinoline 1-oxide by microorganisms. *Chemical & pharmaceutical bulletin* 10(12):1221-1226.

Panigrahi GB, Walker IG. 1991. The reaction of acetyl-4-hydroxyaminoquinoline 1-oxide with DNA: quantitation of single-strand break formation and hyper-reactivity of DNA termini. *Carcinogenesis* 12(6):963-967.

Papp-Szabó E, Douglas GR, Coomber BL, Josephy PD. 2003. Mutagenicity of the oral carcinogen 4-nitroquinoline-1-oxide in cultured BigBlue™ rat tongue epithelial cells and fibroblasts. *Mutation Research* 522(1):107-117.

Paul JS., P. Montgomery O'B Jr., Louis JB. 1971. A Proposed Model of the Interaction of 4-Nitroquinoline 1-Oxide with DNA. *Cancer Research* 31(4):413-419.

Puar MS, Chan TM, Hegde V, Patel M, Bartner P, Ng KJ, Pramanik BN, MacFarlane RD. 1998. Sch 40832: a novel thiostrepton from *Micromonospora carbonacea*. *The Journal of Antibiotics* 51(2):221-4.

Quillardet P, Huisman O, D'Ari R, Hofnung M. 1982. SOS Chromotest, a direct assay of induction of an SOS function in *Escherichia coli* K-12 to measure genotoxicity. *Proceedings of the National Academic of Sciences of USA* 79(19):5971-5975.

Quillardet P, Hofnung M. 1985. The SOS Chromotest, a colorimetric bacterial assay for genotoxins: procedures. *Mutation Research* 147(3):65-78.

Rastogi S, Dogra RKS, Khanna SK, Das M. 2006. Skin tumorigenic potential of aflatoxin B1 in mice. *Food and Chemical Toxicology* 44(5):670–677.

Reigh G, McMahon H, Ishizaki M, Ohara T, Shimane K, Esumi Y, Green C, Tyson C, Ninomiya SI. 1996. Cytochrome P450 species involved in the metabolism of quinoline. *Carcinogenesis* 17(9):1989-1996.

Rodríguez-Loaiza P, Quintero A, Rodríguez-Sotres R, Solano JD, Lira-Rocha A. 2004. Synthesis and evaluation of 9-anilinothiazolo[5,4-b]quinoline derivatives as potential antitumorals. *European Journal of Medicinal Chemistry* 39(1):5-10.

Romero F, Espliego F, Pérez Baz J, García de Quesada T, Grávalos D, de la Calle F, Fernández-Puentes JL. 1997. Thiocoraline, a new depsipeptide with antitumor activity produced by a marine *Micromonospora*. I. Taxonomy, fermentation, isolation, and biological activities. *The Journal of Antibiotics* 50(9):734-7.

Rosenkranz HS, Mersch-Sundermann V, Klopman G. 1999. SOS chromotest and mutagenicity in *Salmonella*: evidence for mechanistic differences. *Mutation Research* 431(1):31-38.

Ruiz-Laguna J, Ariza RR, Prieto-Alamo MJ, Boiteux S, Pueyo C. 1994. Fpg protein protects *Escherichia coli* K-12 from mutation induction by the carcinogen 4-nitroquinoline 1-oxide. *Carcinogenesis* 15(3):425-429.

Ryu CK, Lee JY, Jeong SH, Nho KH. 2009. Synthesis and antifungal activity of 1*H*-pirrolo[3,2-*g*]quinolines-4,9-diones and 4,9-dioxo-4,9-dihydro-1*H*-benzo[*f*]indoles. *Bioorganic & Medical Chemistry Letters* 19(1):146-148.

Saeki KI, Takahashi K, Kawazoe Y. 1993. Metabolism of mutagenicity-deprived 3-fluoroquinoline: Comparison with mutagenic quinoline. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 16(3):232-234.

Saeki KI, Takahashi K, Kawazoe Y. 1996. Potent mutagenic potential of 4-methylquinoline: Metabolic and mechanistic considerations. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 19(4):541-546.

Saeki KI, Kadoi M, Kawazoe Y, Futakuchi M, Tiwawech D, Shirai T. 1997a. Modification of the carcinogenic potency of quinoline, a hepatocarcinogen, by fluorine atom substitution: Evaluation of carcinogenicity by a medium-term assay. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 20(1):40-43.

Saeki KI, Kawai H, Kawazoe Y, Hukura A. 1997b. Dual stimulatory and inhibitory effects of fluorine-substitution on mutagenicity: An extension of the enamine epoxide theory for activation of the quinoline nucleus. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 20(6):646-650.

Saeki KI, Murakami R, Kohara A, Shimizu N, Kawai H, Kawazoe Y, Hakura A. 1999. Substituent effect of a fluorine atom on the mutagenicity of Nitroquinolines. *Mutation Research* 441(2):205–213.

Saha S, Mistri R, Ray BC. 2010. Determination of pyridine, 2-picoline, 4-picoline and quinoline from mainstream cigarette smoke by solid-phase extraction liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1217(3):307-311.

Salles B, Defais M. 1984. Signal of induction of recA protein in *E. coli*. *Mutation Research* 131(2):53-59.

Smith CJ, Perfetti TA, Rumble MA, Rodgman A, Doolittle DJ. 1999. "IARC Group 2A Carcinogens" Reported in Cigarette Mainstream Smoke. *Food and Chemical Toxicology* 38(4):371-383.

Stark AA, Essigmann JM, Demain AL, Skopek TR, Wogan GN. 1979. Aflatoxin B1 mutagenesis, DNA binding, and adduct formation in *Salmonella typhimurium*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 76(3):1343-1347.

Suvire F, Sortino M, Kouznetsov V, Vargas L, Zacchino S, Mora U, Enriz R. 2006. Structure-activity relationship study of homoallylamines and related derivatives acting as antifungal agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 14(6):1851-1862.

Suzuki T, Miyata Y, Saeki KI, Kawazoe Y, Hayashi M, Sofuni T. 1998. In vitro mutagenesis by the hepatocarcinogen quinoline in the *lacZ* transgenic mouse: evidence for its *in vivo* genotoxicity. *Mutation Research* 412(2):161-166

Suzuki T, Wang X, Miyata Y, Saeki KI, Kohara A, Kawazoe Y, Hayashi M, Sofuni T. 2000. Hepatocarcinogen quinoline induces G:C to C:G transversions in the *cII* gene in the liver of lambda/*lacZ* transgenic mice (Muta<sup>TM</sup> Mouse). *Mutation Research* 456(1-2):73-81.

Suzuki T, Takeshita K, Saeki KI, Kadoi M, Hayashi M, Sofuni T. 2007. Clastogenicity of quinoline and monofluorinatedquinolines in Chinese hamster lung cells. *Journal of Health Science* 53(3):325-328.

Tada M, Takahashi K, Kawazoe Y. 1982. Metabolites of quinolines, a hepatocarcinogen, in a subcellular microsomal system. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* 30(10):3834-3837.

Tada M, tada M. 1985. Seryl-tRNA synthetase and activation of the carcinogen 4-nitroquinoline 1-oxide. *Nature* 255(5508):510-512.

Takahashi K, Kamiya M, Sengoko Y, Kodha K, Kawasoe Y. 1988. Deprivation of the mutagenic property of quinoline: Inhibition of mutagenic metabolism by fluorine substitution. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*. 36 (11):4630-4633.

Uppstad H, Øvrebø S, Haugen A, Mollerup S. 2010. Importance of CYP1A1 and CYP1B1 in bioactivation of benzo[a]pyrene in human lung cell lines. *Toxicology Letters* 192(2):221-228.

Urbina JM, Cortés JCG, Palma A, López SN, Zacchino SA, Enriz RD, Ribas JC, Kouznetsov VV. 2000. Inhibitors of the fungal cell wall. Synthesis of 4-aryl-4-N-arylamine-1-butenes and related compounds with inhibitory activities on  $\beta(1-3)$  glucan and chitin synthases. *Biorganic & Medical Chemistry* 8(4):691-698.

Vargas LY, Castelli MV, Kouznetsov VV, Urbina JM, López SN, Sortino M, Enriz RD, Ribas JC, Zacchino S. 2003. In vitro antifungal activity of new series of homoallylamines and related compounds with inhibitory properties of the synthesis of fungal cell wall polymers. *Bioorganic & Medical Chemistry* 11(7):1531-1550.

von der Hude W, Behm C, Girtler R, Basler A. 1988. Evaluation of the SOS chromotest. *Mutation Research* 203 (2):81-94.

von der Hude W, Seelbach A, Basler A. 1990. Epoxides: comparison of the induction of SOS repair in *Escherichia coli* PQ37 and the bacterial mutagenicity in the Ames test. *Mutation Research* 231(2):205-218.

Wild CP, Turner PC. 2002. The toxicology of aflatoxins as a basis for public health decisions. *Mutagenesis* 17(6):471-481.

Wright J, Bolton G, Creswell M, Downing D, Georgic L, Heffner T, Hodges J, MacKenzie R, Wise L. 1996. 8-amino-6-(arylsulphonyl)-5-nitroquinolines: novel nonpeptide neuropeptide Y1 receptor antagonists. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 6 (15):1809-181.

## ANEXOS

Anexo A. Composición y forma de preparación de la mezcla de activación metabólica, soluciones buffer y soluciones sustrato para los ensayos enzimáticos (Modificado del protocolo propuesto por Quillardet y Hofnung, 1985).

### MEZCLA DE ACTIVACIÓN METABÓLICA

#### Composición (1mL)

Solución de sales	0.02 mL
Cloruro de potasio (1.65 M)	
Cloruro de magnesio hexahidratado (0.4 M)	
Glucosa 6 fosfato (1 M)	0.005 mL
Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (0.1 M)	0.015 mL
Buffer tris (hidroximetil) aminometano (0.4 M, pH 7.8)	0.25 mL
Medio Luria Bertani 1X	0.61 mL
Fracción S9 de hígado de rata	0.1 mL

#### Forma de preparación

Adicionar los componentes en el orden presentado arriba y mantener éstos en baño de hielo durante la preparación. Precalear la mezcla por unos minutos a 37°C para evitar que las células sufran un choque térmico.

## **BUFFER Z**

### **Composición (1L)**

Fosfato de sodio dibásico anhidro	16.1 g
Fosfato de sodio monobásico monohidratado	5.5 g
Cloruro de potasio	0.75 g
Sulfato de magnesio heptahidratado	0.25 g
Sodio dodecil sulfato	1 g
β-mercaptoetanol	2.7 mL
pH final: 7.0	

### **Forma de preparación**

Adicionar los componentes en el orden presentado arriba y esterilizar a una atmosfera de presión (~121°C) durante 15 minutos. Conservar entre 4 y 8°C.

## **BUFFER T**

### **Composición (1L)**

Tris (hidroximetil) aminometano	121 g
Sodio dodecil sulfato	1 g
pH final: 8.8	

### **Forma de preparación**

Adicionar los componentes en el orden presentado arriba y esterilizar a una atmosfera de presión (~121°C) durante 15 minutos. Conservar entre 4 y 8°C.

## **SOLUCIÓN SUSTRATO β-GALACTOSIDASA (0.04 g/mL)**

Pesar 0.04 g de 2-nitrofenil-β-D-galactopiranosido (ONPG) y disolver en 10 mL de Buffer fosfato. Conservar a 0°C máximo por un mes.

## **Buffer fosfato**

### **Composición (1L)**

Solución fosfato de sodio dibásico anhidro	61mL
Solución fosfato de sodio monobásico monohidratado	39 mL
pH final: 7.0	

### **Forma de preparación**

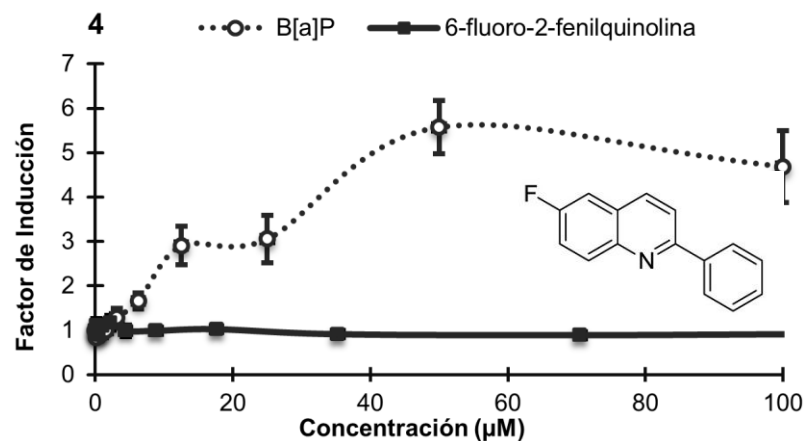
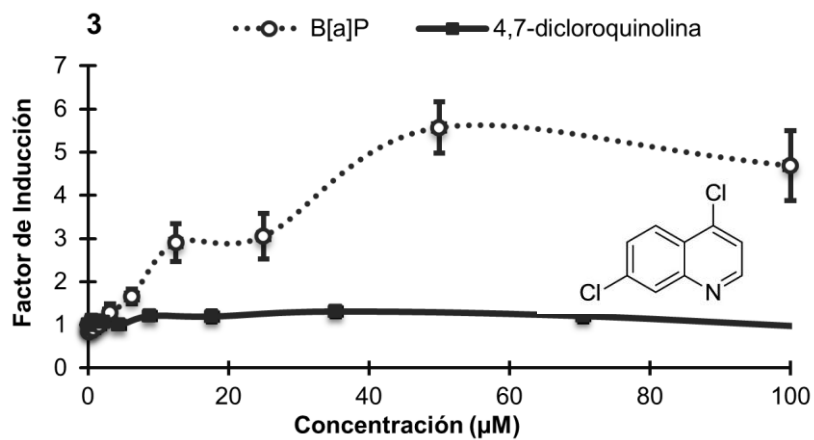
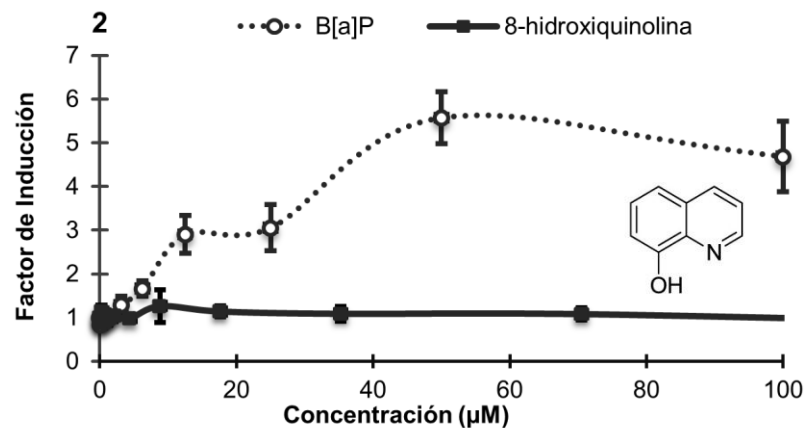
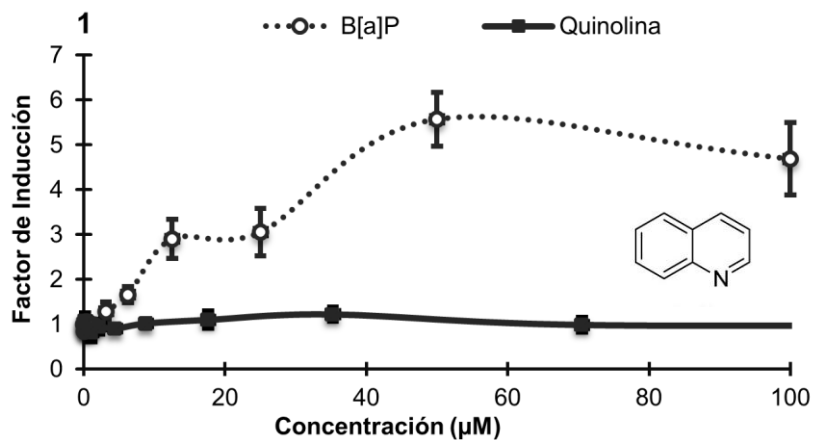
Adicionar los componentes en el orden presentado arriba y esterilizar a una atmosfera de presión (~121°C) durante 15 minutos. Conservar entre 4 y 8°C.

### **SOLUCIÓN SUSTRATO FOSFATASA ALCALINA (0.04 g/mL)**

Pesar 0.04 g de 4-nitrofenilfosfato (PNNP) y disolver en 10 mL de Buffer T. Conservar a 0°C máximo por un mes.

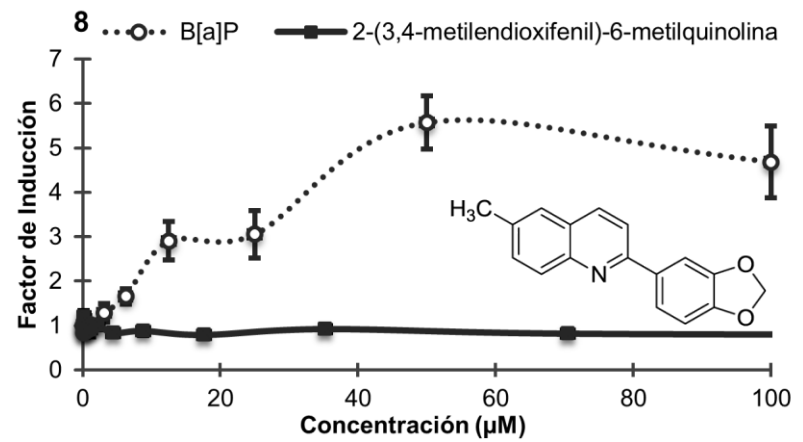
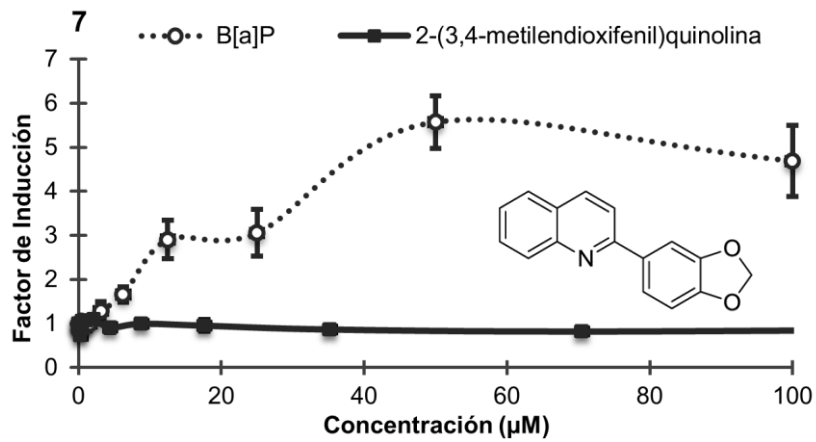
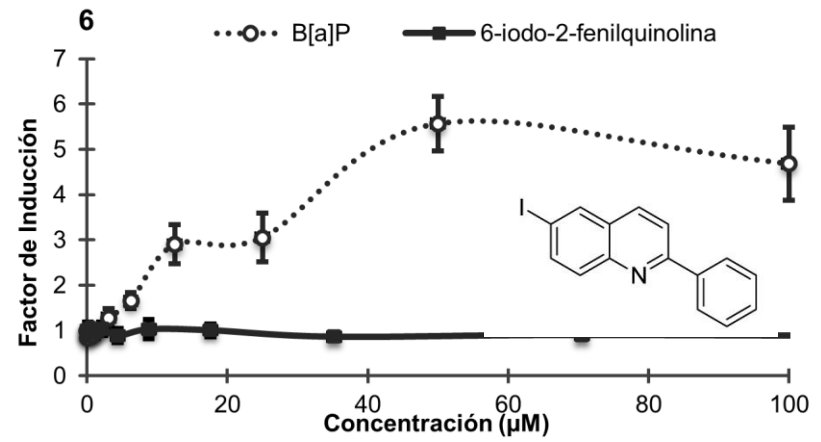
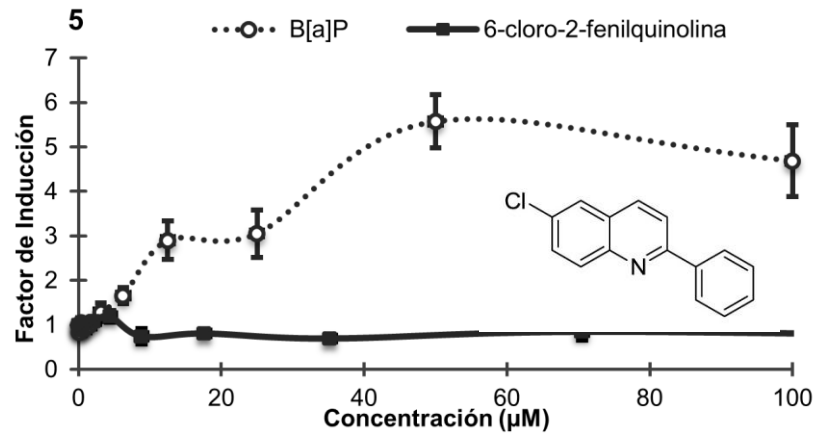
Anexo B. Cinética de inducción del gen *suIA* en *E. coli* PQ37 para derivados de la quinolina

94



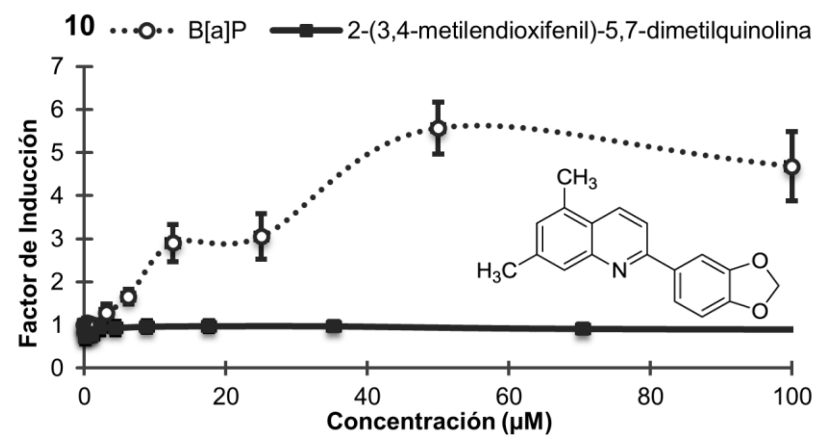
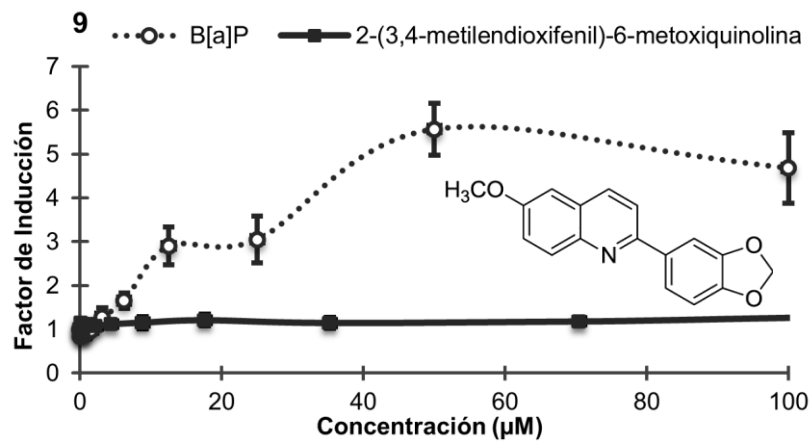
Anexo B. (Continúa)

96



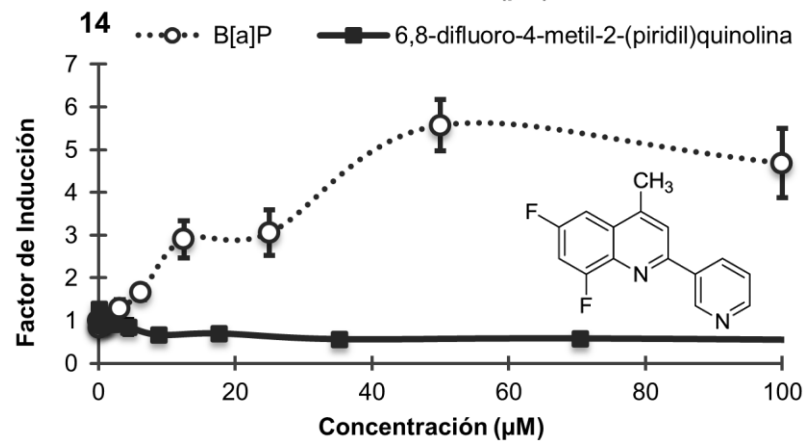
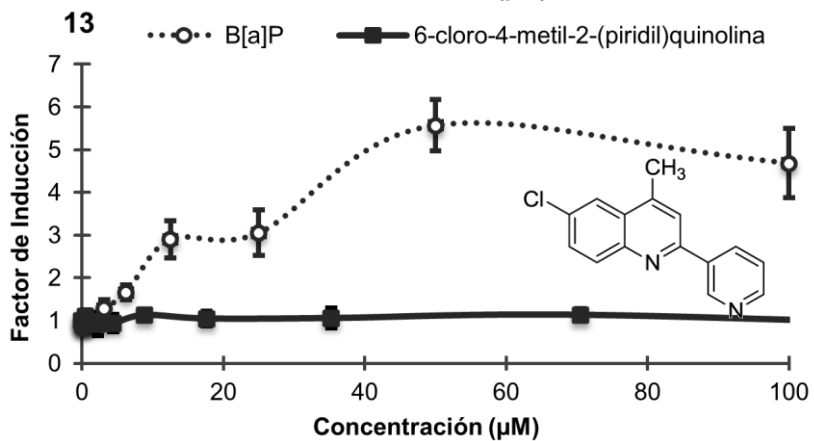
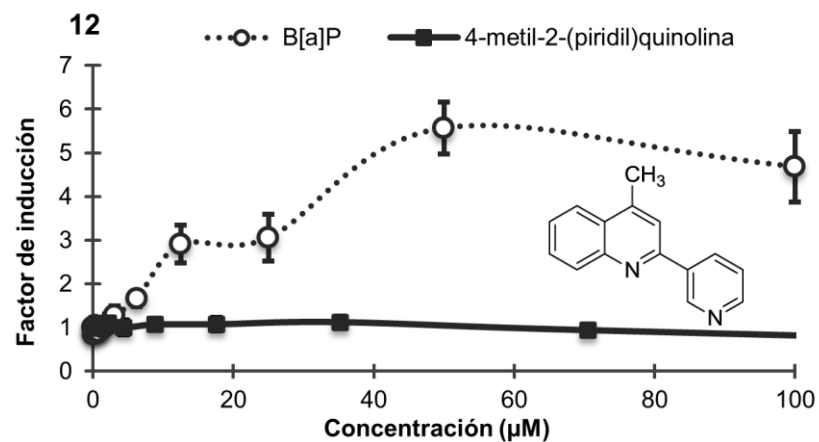
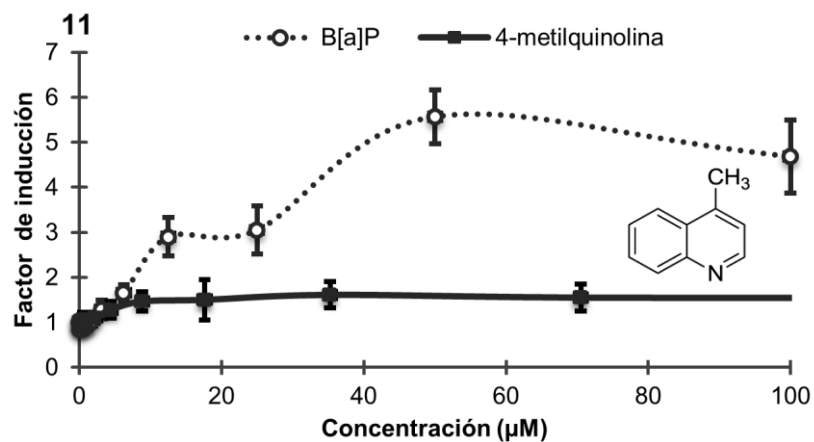
Anexo B. (Continúa)

96



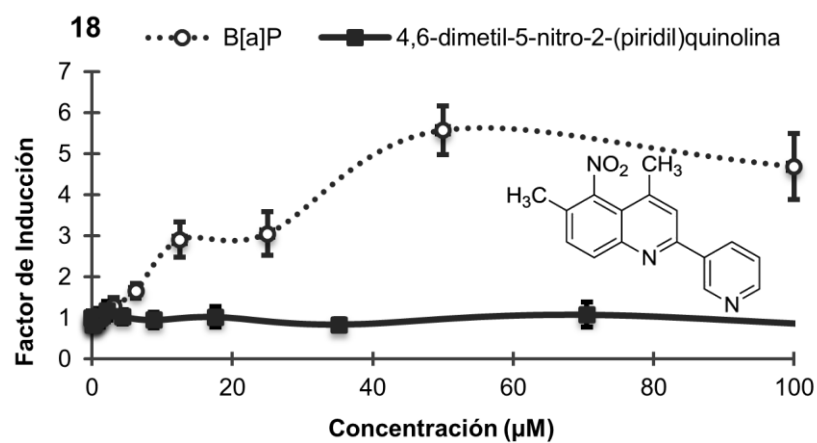
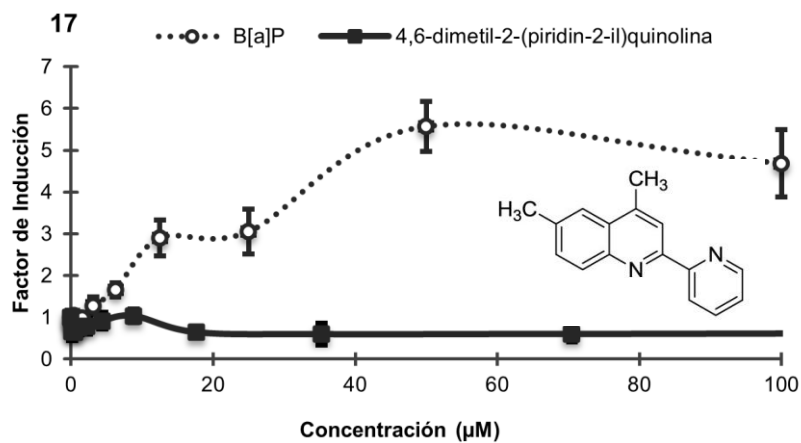
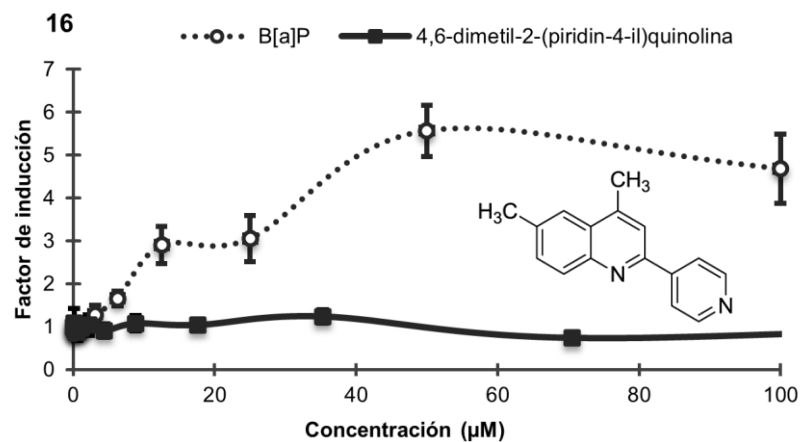
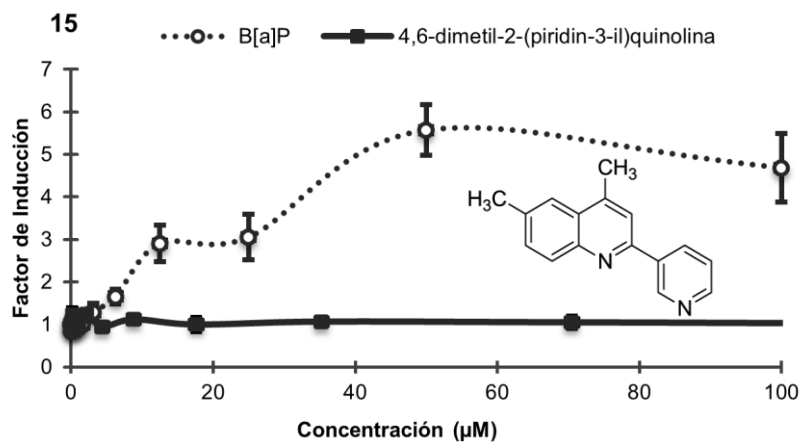
Anexo C. Cinética de inducción del gen *suIA* en *E. coli* PQ37 para derivados de la 4-metilquinolina

97



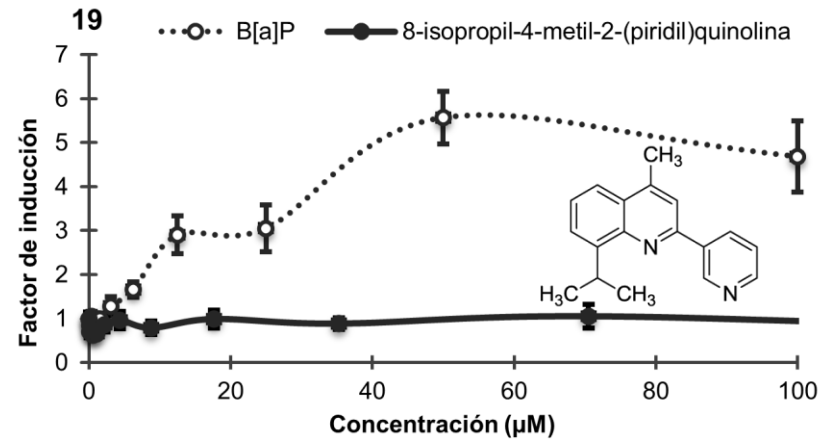
Anexo C. (Continúa)

86



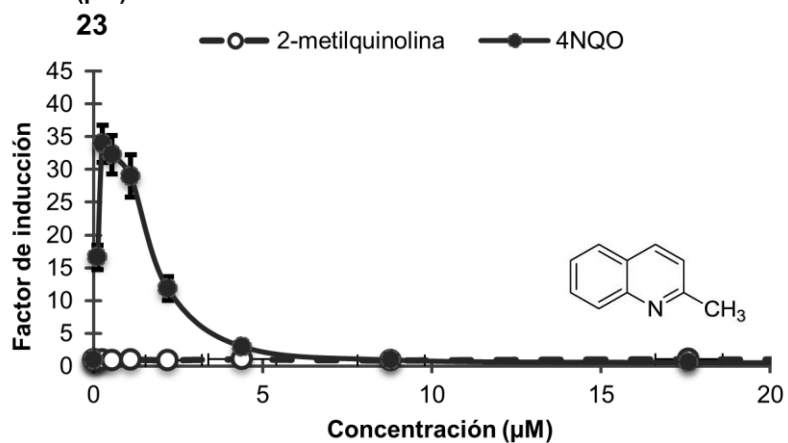
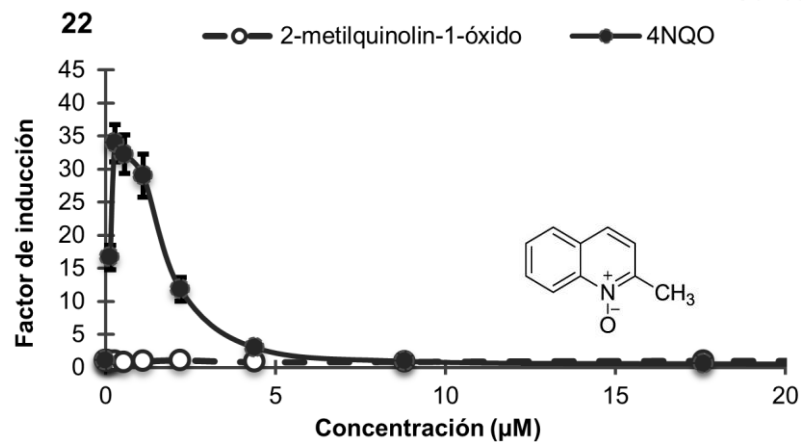
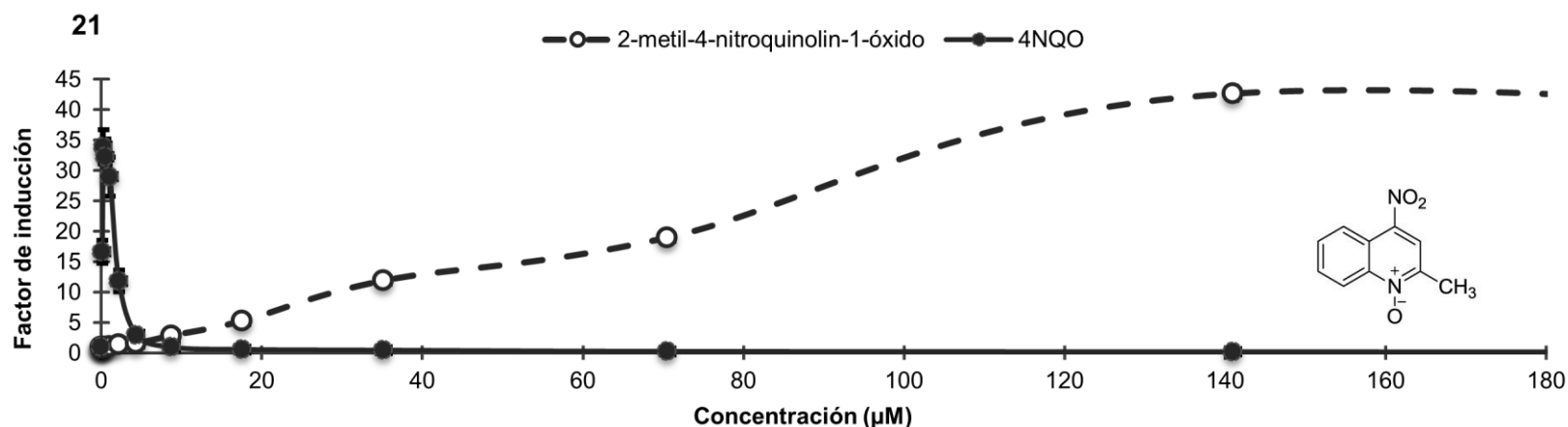
Anexo C. (Continúa)

66



Anexo D. Cinética de inducción del gen *sulA* en *E. coli* PQ37 para quinolinas basadas en la estructura 4-nitroquinolin-1-óxido

100



Anexo D. (Continúa)

101

