

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

2024 Bahía Blanca, Argentina

Tesis de Doctorado en Bioquímica

NUEVOS INHIBIDORES DE AKT - UN ENFOQUE INTERDISCIPLINARIO:

DESDE LA SÍNTESIS DE DERIVADOS DE ACRIDONA Y XANTONA, HASTA SU EVALUACIÓN EN CÉLULAS DE MÚSCULO ESQUELÉTICO Y RABDOMIOSARCOMA

Bioquímica Agustina Gonzalez

Directora: Claudia G. Buitrago / Co-Director: Darío C. Gerbino

ii

Prefacio

Esta Tesis se presenta como parte de los requisitos para optar al grado Académico de Doctora en Bioquímica de la Universidad Nacional del Sur (UNS) y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta Universidad u otra. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el ámbito del Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia durante el período comprendido entre el año 2019 y 2024, bajo la dirección y aval de la Dra. Claudia Graciela Buitrago, Profesora Adjunta de Química Biológica General de la UNS e Investigadora Independiente del CONICET (INBIOSUR, CONICET-UNS); y la co-dirección y aval del Dr. Darío César Gerbino, Profesor Asociado de Química Orgánica de la UNS e Investigador Independiente del CONICET (INQUISUR, CONICET-UNS).

Bioquímica Agustina Gonzalez



Agradecimientos

Quiero agradecer a CONICET por concederme una Beca Doctoral que me permitió el desarrollo de este Trabajo de Tesis y a sus instituciones: INBIOSUR (CONICET-UNS) e INQUISUR (CONICET-UNS) que me dieron un lugar de trabajo.

A Claudia, por permitirme formar parte de su grupo de investigación, por guiarme durante todos estos años, por exigirme y siempre alentarme a ser mejor y decirme que podía con todo. En algún punto se convirtió en una mamá en el trabajo, siempre dispuesta a ayudarme en lo que necesitara, a darme ese aliento cuando las cosas no salían como esperaba.

A Paula, mi guía y mano derecha en todo lo que era el trabajo de mesada, si habrá escuchado infinidad de veces: Pau ¿Te puedo hacer una pregunta? Me enseñó cada uno de los detalles de todas las técnicas que aprendí. Siempre fuimos un equipo, ella preparaba el mate y yo lo cebaba.

A cada uno de mis compañeros del Laboratorio de Química Biológica del cuarto piso, que me ayudaron en todo lo que necesitaba, incluso al comienzo cuando andaba detrás de cada uno de ellos, para tratar de aprender de todos y absorber todos sus conocimientos, sabiduría y experiencia. A Silvi, mi compañerita de oficina; desde el primer día en que llegó al laboratorio fuimos compinches y éramos dos loritos parlanchines; con ella compartí horas de charlas de la vida, frustraciones, problemas y alegrías.

A Darío, que me guío en un mundo bastante nuevo y diferente para mí, el mundo de la Química Orgánica, siempre dispuesto a ayudarme e incentivarme. Como así también a todos mis compañeros del Laboratorio de Química Orgánica, sobre todo Pame, Sabri y Cholo, que hicieron más ameno mi trabajo diario y me ayudaron en cada problema que se me presentaba. Lab A y Lab B un solo corazón.

A mis amigos, los que me acompañan desde el comienzo y los que me permitió conocer este trabajo. Como siempre digo, al ser de afuera (no originaria de Bahía Blanca) los amigos son la familia que uno elige. A mis compañeros de docencia de las cátedras por las que pasé. Principalmente "Inmuno", la cátedra en la que inicié mis pasos en la docencia, algo que nunca imaginé hacer y que me enamoró, los que me enseñaron todo en la docencia, los que me tenían paciencia cuando todos los días iba y les decía: Ile, Marce, ¿Les puedo hacer una pregunta?, tengo una duda, y siempre estaban para ayudarme, y aún lo siguen haciendo cada día. También a "Clínicos I", si bien tuve un paso fugaz de un cuatrimestre, fue una experiencia enriquecedora y me llevo excelentes personas. A "Toxico", última materia en la que me incorporé, con gente ya conocida, un mundo diferente pero fascinante. Nunca imaginé tener de colegas a mis profesores.

Y principalmente y a quienes dedico mi tesis, es a mi Familia, sobre todo mis papás y mi hermana, que siempre me apoyaron en todo lo que decidí y siempre estuvieron para mí. Así como también a mi familia de cuatro patas, sobre todo a la Morita, mi fiel compañera peluda. Los amo con todo mi corazón, y a ellos les dedico este trabajo.

Ohana significa Familia

A mi Familia.

Resumen

La vía de señalización intracelular PI3K/PDK1/Akt juega un papel crucial en la regulación de la proliferación, supervivencia y metabolismo celular, siendo frecuentemente desregulada en diversos tipos de cáncer, incluyendo el Rabdomiosarcoma (RMS). Este cáncer agresivo, que afecta principalmente a niños y adolescentes, presenta altos niveles de activación de la quinasa Akt en sus células, lo que contribuye a su resistencia a las terapias convencionales. En consecuencia, la inhibición de esta vía es un objetivo terapéutico clave. En este trabajo de Tesis Doctoral, se ha abordado el desarrollo y evaluación de una serie de derivados de acridona y xantona, como novedosos potenciales inhibidores de la vía PI3K/PDK1/Akt en líneas celulares de RMS (RD) y de músculo esquelético normal (C2C12).

La primera etapa de esta investigación se centró en el diseño, síntesis y caracterización de derivados de acridona. Entre ellos, el compuesto **AC5DIE** se destacó por ser el más efectivo en inhibir la activación de Akt cuando fue evaluado en los modelos celulares a concentraciones de 0.5 y 1.0 μ M, tras 24 y 48 horas de tratamiento, superando incluso la eficacia del inhibidor conocido LY294002.

Además, se llevaron a cabo estudios teórico-computacionales para evaluar la interacción de los compuestos con PDK1, una quinasa clave en la activación de Akt. Se propone que PDK1 podría ser uno de los objetivos moleculares de esta nueva serie de derivados de acridona. Estos estudios no solo validan el potencial inhibidor de los compuestos en la vía PI3K/PDK1/Akt, sino que también sugieren su capacidad para actuar en múltiples nodos de esta, lo que aumenta su relevancia como candidatos terapéuticos. Los estudios biológicos e *in silico* revelaron que **AC5DIE** podría considerarse como el prototipo más prometedor para el desarrollo de nuevos agentes antitumorales.

Por último, se diseñó, sintetizó y caracterizó el análogo oxigenado de **AC5DIE**, el compuesto **XA5DIE**, derivado de xantona que demostró tener una citotoxicidad selectiva reduciendo significativamente la viabilidad celular de células RD sin afectar la viabilidad de las células C2C12, lo que subraya su actividad selectiva en células tumorales, con un potencial terapéutico que minimiza los efectos secundarios en tejidos sanos.

El enfoque multidisciplinario de esta Tesis, que combina técnicas de diseño, síntesis química, investigaciones biológicas y modelado molecular, ha permitido una caracterización exhaustiva de varios nuevos prototipos. Los resultados obtenidos no solo destacan la efectividad de los derivados de acridona y xantona como inhibidores de Akt, sino que también subrayan su baja citotoxicidad en células no cancerosas, lo que es crucial para el desarrollo de tratamientos anticancerígenos más seguros y específicos.

En conclusión, los derivados de acridona y xantona sintetizados en el transcurso de esta Tesis Doctoral representan una prometedora nueva clase de inhibidores de la vía PI3K/PDK1/Akt, con potencial para

avanzar hacia estudios preclínicos. Los resultados obtenidos proporcionan una base sólida para la investigación futura, enfocada en optimizar estos compuestos y evaluar su aplicación en el tratamiento de cánceres resistentes a las terapias actuales, como el Rabdomiosarcoma.

Abstract

The PI3K/PDK1/Akt intracellular signaling pathway plays a crucial role in regulating cellular proliferation, survival, and metabolism, and is frequently dysregulated in various cancer types, including Rhabdomyosarcoma (RMS). This aggressive cancer, which primarily affects children and adolescents, exhibits high levels of Akt kinase activation in its cells, contributing to resistance to conventional therapies. Consequently, inhibiting this pathway is a key therapeutic target. This Doctoral Thesis focuses on the development and evaluation of a series of acridone and xanthone derivatives as novel potential inhibitors of the PI3K/PDK1/Akt pathway in RMS (RD) and normal skeletal muscle (C2C12) cell lines.

The first stage of this research focused on the design, synthesis, and characterization of acridone derivatives. Among them, the compound **AC5DIE** stood out as the most effective in inhibiting Akt activation when evaluated in cellular models at concentrations of 0.5 and 1.0 μ M after 24 and 48 hours of treatment, even surpassing the efficacy of the known inhibitor LY294002.

Additionally, theoretical-computational studies were conducted to assess the interaction of the compounds with PDK1, a key kinase in Akt activation. It is proposed that PDK1 could be one of the molecular targets of this new series of acridone derivatives. These studies not only validate the inhibitory potential of the compounds in the PI3K/PDK1/Akt pathway but also suggest their ability to act on multiple nodes within it, enhancing their relevance as therapeutic candidates.

Biological and in silico studies revealed that **AC5DIE** could be considered the most promising prototype for the development of new anticancer agents.

Finally, the oxygenated analog of **AC5DIE**, the compound **XA5DIE**, derived from xanthone, was designed, synthesized, and characterized. This compound demonstrated selective cytotoxicity, significantly reducing the viability of RD cells while not affecting the viability of C2C12 cells, highlighting its selective activity in tumor cells and therapeutic potential that minimizes side effects on healthy tissues.

The multidisciplinary approach of this Thesis, which combines design techniques, chemical synthesis, biological investigations, and molecular modeling, has enabled a thorough characterization of several new prototypes. The results obtained not only highlight the effectiveness of the acridone and xanthone derivatives as Akt inhibitors but also emphasize their low cytotoxicity in non-cancerous cells, which is crucial for developing safer and more specific anticancer treatments.

In conclusion, the acridone and xanthone derivatives synthesized during this Doctoral Thesis represent a promising new class of PI3K/PDK1/Akt pathway inhibitors with the potential to advance toward preclinical studies. The results provide a solid foundation for future research aimed at optimizing these

viii

compounds and evaluating their application in the treatment of cancers resistant to current therapies, such as Rhabdomyosarcoma.

Índice

Prefacio	iii
Agradecimientos	iv
Resumen	vi
Abstract	viii
Índice	x
Abreviaturas	xiii
CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN	1
1.1 Compuestos heterocíclicos	1
1.1.1 Acridonas	1
1.1.2 Xantonas	4
1.1.3 Flavonas	5
1.2 Conceptos básicos de química computacional	7
1.2.1 <i>Docking</i> molecular	7
1.2.2 Algoritmos de búsqueda	
1.2.3 Funciones de puntuación (Scoring functions)	8
1.2.4 Dinámica molecular	9
1.3 Sistema muscular humano	9
1.3.1 Músculo esquelético	
1.3.2 Rabdomiosarcoma	
1.4 Vías de señalización intracelulares	15
1.4.1 Vía PI3K/PDK1/Akt	
1.4.2 Inhibidores de PI3K/PDK1/Akt	
CAPÍTULO 2: OBJETIVOS	
CAPÍTULO 3: SECCIÓN EXPERIMENTAL	21
3.1 Materiales y métodos: Sección química	21
3.1.1 Derivados de Acridona	21
3.1.2 Derivado de Xantona	
3.2 Materiales y métodos: Ensayos biológicos	
3.2.1 Preparación de medio de cultivo	
3.2.2 Uso de la campana de flujo laminar	
3.2.3 Descongelado de células	
3.2.4 Congelado de células	
3.2.5 Cultivo celular	

3.2.6 Ensayos Western blot	. 39
3.2.7 Ensayo de Viabilidad celular con <i>Trypan Blue</i>	. 50
3.2.8 Citometría de Flujo por incorporación de loduro de Propidio	. 52
3.2.9 Ensayo de la herida	. 54
3.2.10 Tinción con <i>MitoTracker</i> y DAPI	. 55
3.2.11 Lavado de materiales	. 57
3.2.12 Análisis estadístico de los resultados	. 57
CAPÍTULO 4: RESULTADOS Y DISCUSIÓN	. 58
4.1 Sección Química	. 58
4.2 Ensayos biológicos	. 66
4.2.1 Primer abordaje de las acciones de los compuestos AC5DIE y AC5MOR en la línea celular tumoral	. 67
4.2.2 Efectos producidos por los compuestos AC5DIE y AC5MOR en la línea celular normal	.72
4.2.3 Evaluación de los compuestos AC5DIE, AC5MOR, AC5PIR y AC5PIP en C2C12	. 77
4.2.4 Efectos de los compuestos AC4MOR, AC5DIE, AC5MOR y AC6MOR sobre la viabilidad celular de células normales de músculo esquelético y células de RMS	. 84
4.2.5 Cambios en la fosforilación de Akt (activación) inducidos por los compuestos AC4MOR, AC5DIE, AC5MOR y AC6MOR en células normales y cancerosas	. 86
4.3 Resultados del modelado molecular	. 96
4.3.1 PDK1 como objetivo molecular	. 96
4.3.2 Simulaciones de dinámica molecular de PDK1-PS653 y PDK1-3b: Estabilidad estructural d complejo y cálculos absolutos de energía de unión.	iel . 98
4.3.3 Análisis de la dinámica de PDK1: Matriz de correlación cruzada dinámica y análisis de componentes principales	107
4.4 Derivado de Xantona	110
4.4.1 Efecto de XA5DIE sobre la viabilidad de células de RMS y C2C12	111
4.4.2 Cambios en la densidad celular, el metabolismo mitocondrial y el estado de los núcleos evaluados con Tinción de <i>MitoTracker</i> y DAPI	112
4.4.3 Cambios en la activación de Akt inducidos por XA5DIE en células de RMS y C2C12	113
4.4.4 Efectos de los compuestos AC5DIE y XA5DIE sobre la migración celular	118
CAPÍTULO 5: OTRAS INVESTIGACIONES DESARROLLADAS DURANTE EL TRANSCURSO DE ESTE TRABAJO DE TESIS DOCTORAL	129
5.1 Introducción	129
5.2 Síntesis estereoselectiva de 4-tiazolidinonas catalizada por zeolitas. Evaluación de su potencia en células de músculo esquelético normal y tumoral	al 129
5.2.1 Efecto de los compuestos 10a-cii sobre la viabilidad celular en las líneas celulares C2C12 RD	'y 131

5.2.2 Cambios en la activación de Akt inducidos por los compuestos 10a-cii en las líneas celulare C2C12 y RD	es 33
5.3 Conclusión13	34
CAPÍTULO 6: CONCLUSIONES GENERALES 13	35
6.1 Sobre el enfoque interdisciplinario13	35
6.2 Sobre los resultados de la Síntesis Química13	36
6.3 Sobre los resultados de los Ensayos Biológicos y de Modelado Molecular	36
6.4 Reflexión final	40
Trabajos generados a partir del desarrollo de esta Tesis Doctoral y otras investigaciones en colaboración	41
Publicaciones en revistas científicas internacionales con referato	41
Publicaciones en Congresos Científicos Internacionales14	41
Referencias Bibliográficas	43
ANEXO	55
Espectros de RMN de los compuestos sintetizados15	55

Abreviaturas

1,3-DHA: 1,3-dihidroxiacridona.

1,3-DHX: 1,3-dihidroxixantona.

AC4MOR: 1-hidroxi-3-(4-morfolinobutoxi)acridin-9(10H)-ona (3a).

AC5DIE: 3-((5-(dietilamino)pentil)oxi)-1-hidroxiacridin-9(10H)-ona (3b).

AC5MOR: 1-hidroxi-3-((5-morfolinopentil)oxi)acridin-9(10H)-ona (3c).

AC5PIP: 1-hidroxi-3-((5-(piperidin-1-il)pentil)oxi)acridona (3e).

AC5PIR: 1-hidroxi-3-((5-(pirrolidin-1-il)pentil)oxi)acridona (3d).

AC6MOR: 1-hidroxi-3-((6-morfolinohexil)oxi)acridin-9(10H)-ona (3f).

CG-EM: Cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas.

DCCM: Matriz de correlación cruzada dinámica.

DM: Dinámica molecular.

DMSO: Dimetilsulfóxido.

FM: Fase móvil.

IR: Espectroscopía de infrarrojo.

PCA: Análisis de componentes principales.

Rf: Factor de retención.

RMN: Resonancia Magnética Nuclear.

RMS: Rabdomiosarcoma.

TLC: Cromatografía en capa fina.

XA5DIE: 3-((5-(dietilamino)pentil)oxi)-1-hidroxi-9H-xanten-9-ona (6).

1.1 Compuestos heterocíclicos

Los compuestos heterocíclicos son compuestos cíclicos que contienen al menos un átomo distinto al carbono formando parte de la estructura cíclica. Los átomos distintos al carbono presentes en el ciclo se denominan heteroátomos. Los compuestos heterocíclicos representan una clase diversa de compuestos químicos con una amplia gama de aplicaciones biológicas.

Una estrategia interesante aplicada al desarrollo de nuevos fármacos consiste en el uso de las llamadas "estructuras privilegiadas", fragmentos heterocíclicos rígidos que muestran una alta afinidad por diversas dianas biológicas, facilitando interacciones favorables con múltiples biomoléculas ^{1–5}. Esta característica convierte a los compuestos heterocíclicos en candidatos prometedores para el desarrollo de nuevos principios activos.

En la investigación biomédica, los compuestos heterocíclicos han sido evaluados por su potencial terapéutico en áreas que involucran a las enfermedades infecciosas, inflamatorias y, particularmente, en el tratamiento del cáncer ^{5,6}. Esta familia de heterociclos fusionados es altamente versátil en términos de actividad biológica ⁷, gracias a su arquitectura molecular basada en un esqueleto hidrofóbico que permite la funcionalización en múltiples sitios; cabe mencionar que la posición y la naturaleza del sustituyente en el núcleo heterocíclico son determinantes para sus propiedades biológicas y su selectividad.

Una fuente prometedora de andamiaje para diseñar moléculas bioactivas son los derivados de acridona y sus congéneres, que resultan de gran interés terapéutico debido a su actividad comprobada en contextos biológicos muy diversos ^{1,2}.

En este Trabajo de Tesis Doctoral, dentro de la familia de compuestos heterocíclicos, nos enfocamos en los derivados de acridona y sus análogos oxigenados denominados xantonas.

1.1.1 Acridonas

Las acridonas constituyen una clase de compuestos heteroaromáticos definidos químicamente como sistemas dibenzo-y-piridonas y son consideradas una subclase de acridinas.

¿En qué consiste el sistema dibenzo- γ -piridona? La piridona contiene un anillo insaturado de seis miembros con un átomo de nitrógeno y un grupo funcional carbonilo. Existen distintos isómeros (**Figura 1.1**) según la posición relativa del carbonilo y el nitrógeno: α (alfa), β (beta) y γ (gamma).



Figura 1.1. Regioisómeros alfa y gamma del anillo piridona.

El sistema dibenzo-y-piridona consiste entonces en la y-piridona y dos bencenos fusionados uno a cada lado de la piridona (**Figura 1.2**) constituyendo el andamiaje acridona.



Figura 1.2. Esqueleto básico del núcleo acridona.

Un poco de historia...

La acridina y sus análogos han generado un gran interés técnico y científico desde 1870 cuando Grabe y Caro descubrieron la acridina en una fracción de alto punto de ebullición del carbón. Ehrlich y Benda propusieron por primera vez el uso de las aminoacridinas como agentes antimicrobianos en 1912. Durante la Primera Guerra Mundial (1914-1918), las acridinas se utilizaron como antisépticos para las heridas. En 1932 se descubrió la mepacrina (quinacrina), un fármaco antipalúdico a base de acridina que fue utilizado durante la Segunda Guerra Mundial (1939-1945). En 1944, la penicilina sustituyó a la terapia basada en la acridina como antiséptico ⁸.

En 1948, la acronicidina, un alcaloide natural de acridona, se aisló del árbol australiano *Acronychia baueri*^{9,10}, y en 1966 Eli-Lilly determinó su actividad antitumoral en modelos de tumores sólidos murinos como los sarcomas S-180 y AKR, el mieloma X-5563, el carcinoma S-115 y el melanoma S-91. Así fue como el descubrimiento de la acronicina abrió un nuevo campo de investigación para los derivados de acridona como agentes anticancerígenos. En la década de los años '70 se descubrieron dos fármacos anticancerígenos basados en la acridina, la nitracrina (derivado de la 1-nitroacridina) en Polonia ¹¹ y la 9-anilinoacridina amsacrina (m-AMSA) en Nueva Zelanda ¹². Ambos fármacos ejercían su efecto por interacción con el complejo ADN Topoisomerasa II ¹³. La asulacrina (CI-921), un derivado de

la m-AMSA, mostró interesantes propiedades antitumorales y se sometió a ensayos clínicos de fase II en cáncer de pulmón no microcítico (CPNM) ¹⁴. En 1987, los continuos trabajos sobre la acridina condujeron al desarrollo de un nuevo derivado, la 9-aminoacridina-4-carboxamida (DACA) que actúa a través de interacciones con el complejo de ADN Topoisomerasa I y II ¹⁵.

En la década de los años '90, se sintetizaron derivados de triazoloacridona e imidazoacridona en la Universidad de Gdansk que actúan mediante la inhibición del complejo de ADN Topoisomerasa II ^{16,17}. El derivado de triazoloacridona C-1305 mostró una potente actividad antitumoral frente a una amplia gama de tumores experimentales *in vitro* e *in vivo*, incluidos carcinomas de colon murinos y humanos ¹⁸. El C-1311, el análogo más destacado de la imidazoacridona, se sometió a un ensayo clínico de fase II en pacientes con tumores sólidos avanzados ¹⁹. Además, sus análogos estructurales como la tioacridona, se estudiaron por sus propiedades antimicrobianas contra bacterias, parásitos y hongos. Algunos trabajos en este área aún continúan, en particular para el desarrollo de agentes antipalúdicos, antiprotozoarios y anticancerígenos ¹⁷.

En los últimos años, los derivados de acridona han emergido como eficaces candidatos a fármacos anticancerígenos, atrayendo una atención considerable en el ámbito científico. Además, exhiben otras propiedades biológicas interesantes, como actividades antivirales, antipalúdicas, antiprotozoarias, antimicrobianas, antipsoriásicas; son utilizados como sondas fluorescentes, inhibidores de la acetilcolinesterasa y tienen propiedades antiinflamatorias ^{6,20}. La diversidad en la respuesta biológica de estos compuestos ha impulsado a los investigadores a explorar este andamiaje para descubrir su potencial acción frente a diversas actividades ²¹.

Como se describió anteriormente, los derivados de acridona son una de las clases más antiguas y destacadas de agentes bioactivos. Estos compuestos han demostrado ser útiles en diversas áreas ⁶. Su importancia se detalla a continuación:

- Intercaladores de ADN: las razones de la amplia utilidad de las acridinas como agentes quimioterapéuticos de amplio espectro son variadas, pero podemos mencionar su síntesis relativamente fácil, su estabilidad biológica y habilidad para unirse eficientemente al ADN y lograr la disrupción de su función en las células ^{13,15–17}. Varios aspectos de la unión de las acridinas al ADN se han considerado relevantes para sus efectos quimioterapéuticos.
- Drogas antineoplásicas: Han sido conocidas y usadas en clínica desde los años '70. Esta actividad se atribuyó principalmente a la planaridad de estas estructuras aromáticas, que les permite intercalarse dentro de la estructura de ADN de doble hebra, interfiriendo así con la maquinaria celular. Los derivados de acridona constituyen una clase de compuestos que son intensamente estudiados como potenciales drogas anticáncer²⁰.

- <u>Drogas antibacterianas</u>: Aunque las acridinas no han sido mayormente utilizadas como agentes antibacterianos durante muchos años, debido al desarrollo de agentes más potentes, el reciente aumento de infecciones bacterianas multirresistentes ha llevado al resurgimiento del interés en esta área.
- <u>Agentes antiprotozoarios</u>: Se hallaron derivados de acridina eficaces contra la malaria ²², y diversas especies de *Trypanosoma* y *Leishmania* ²³.

1.1.2 Xantonas

Desde el punto de vista químico, las xantonas representan una serie de compuestos heterocíclicos oxigenados con un andamiaje dibenzo-y-pirona ^{24,25}.

¿Qué es el andamiaje dibenzo- γ -pirona? Las pironas o piranonas contienen un anillo insaturado de seis miembros con un átomo de oxígeno y un grupo carbonilo. Existen distintos isómeros según la posición relativa del grupo carbonilo y el oxígeno: α (alfa), β (beta) y γ (gamma), como se esquematizó previamente para el caso de las piridonas.

La estructura 2-pirona (o α-pirona) se encuentra en la naturaleza formando parte del sistema de anillos de la *cumarina*. La 4-pirona (o γ-pirona) se encuentra en algunos compuestos químicos naturales tales como la *cromona* (**Figura 1.3**).



Figura 1.3. Estructura base del esqueleto cumarina y cromona.

En conclusión, el andamiaje dibenzo-γ-pirona consiste en una γ-pirona, con dos bencenos fusionados uno a cada lado del anillo central de la 4-pirona, constituyendo así el andamiaje xantona (**Figura 1.4**). Podemos observar que se trata del análogo estructural oxigenado de la acridona.



Figura 1.4. Esqueleto básico de xantona.

Su "estructura privilegiada" se encuentra ampliamente distribuida en la naturaleza. La actividad biológica de esta clase de compuestos está asociada con su estructura tricíclica, pero varía dependiendo de la naturaleza y/o posición de los diferentes sustituyentes. Las xantonas pueden ser consideradas como estructuras biocompatibles dado que sus derivados son capaces de interactuar con varias dianas biológicas ²⁵. El andamiaje xantona tiene múltiples actividades biológicas, tales como actividad antioxidante, antiinflamatoria, antihipertensiva, antitrombótica, anticáncer, actividad inhibitoria de la α-glucosidasa, antibacteriana y antifúngica dependiendo de los sustituyentes incorporados en el sistema de anillos que dan lugar a una gran variedad de compuestos bioactivos ^{7,26–}²⁸.

1.1.3 Flavonas

Se conoce que los compuestos naturales que se encuentran en las plantas pueden ser útiles como agentes quimiopreventivos o quimioterapéuticos para diversos tipos de cáncer ²⁹. Hoy en día, los fitoquímicos se han convertido en una parte importante de los medicamentos contra el cáncer. De hecho, más del 75% de los fármacos anticancerígenos no biológicos aprobados entre 1981 y 2007 son productos naturales o se desarrollaron a partir de ellos ^{30,31}.

Las flavonas son productos naturales de la clase de los benzopiranos (**Figura 1.5**) y constituyen un grupo importante de heterociclos de oxígeno que se distribuyen ampliamente en el reino vegetal como metabolitos secundarios ³², protegiendo a las plantas de la radiación ultravioleta, atrayendo insectos para la polinización e interaccionando con los microbios del suelo ³³. Debido a su presencia generalizada en frutas y verduras, son también valiosos como antioxidantes en humanos ³⁴.



Figura 1.5. Estructura del benzopirano.

Son conocidas por tener una amplia gama de actividades farmacológicas como anticancerígenas, antiinflamatorias, antiosteoporóticas, antidiabéticas y quelantes de metales ^{30,35}. Debido a su amplia gama de importantes actividades biológicas, esta familia de moléculas ha sido ampliamente investigada y se han aislado de las plantas más de 4000 flavonoides químicamente únicos. Como resultado, este importante sistema de anillos sigue siendo un atractivo para los químicos de todo el mundo ³⁶.

El término "flavonoide" se utiliza generalmente para describir un amplio grupo de productos naturales que poseen una estructura de carbono C_6 - C_3 - C_6 , o más específicamente un esqueleto de fenilbenzopirano. Los tres anillos del núcleo del fenilbenzopirano son denominados anillos A, B y C (pirano).

Según la nomenclatura IUPAC, estos grupos de productos naturales se dividen en *flavonas*, *isoflavonas* y *neoflavonas* (**Figura 1.6**), según la posición del enlace del anillo de fenilo con respecto al benzopirano.



Figura 1.6. Estructuras de las flavonas, isoflavonas y neoflavonas.

La Quercetina (**Figura 1.7**) pertenece a la clase llamada flavonoles, que se encuentran principalmente en manzanas, té, cebollas, nueces, bayas, etc. Se caracteriza por tener una amplia gama de actividades biológicas entre las que se incluyen anticancerígenas, antiinflamatoria, agregación plaquetaria, antiviral, antidiabética y antiobesidad ^{37–40}.



Figura 1.7. Estructura de la quercetina.

A partir de la Quercetina se obtiene el LY294002 (**Figura 1.8**), un conocido inhibidor comercial de PI3K/Akt ⁴¹. El compuesto sintético LY294002, 2-(4-morfolinil)-8-fenil-4*H*-1-benzopirano-4-ona, junto con el metabolito fúngico Wortmanina, han sido una herramienta farmacológica clave para delinear el papel crucial de la fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3K) en la regulación de vías de señalización intracelulares ^{42,43}.



Figura 1.8. Compuesto comercial LY294002.

A pesar de los avances en la síntesis y aplicación de estos compuestos, la búsqueda de agentes anticancerígenos efectivos sigue siendo un desafío crucial. Identificar compuestos con actividad específica terapéutica contra ciertos tipos de cáncer menos estudiados como el Rabdomiosarcoma (RMS), fue uno de los desafíos de este Trabajo de Tesis Doctoral. Los métodos *in-silico* aplicados al diseño racional de fármacos, constituyen una herramienta valiosa para identificar nuevos principios activos para diversas afecciones, como veremos a continuación.

1.2 Conceptos básicos de química computacional

1.2.1 Docking molecular

Los métodos de *docking* molecular permiten predecir rápidamente la estructura de complejos proteína-ligando y estimar su afinidad. Usualmente, la proteína se mantiene en una dada conformación (rígida) y se identifican diferentes poses para el ligando (flexible), de las cuales se selecciona aquella que presente una mayor afinidad. Para esto, se requiere conocer la estructura tridimensional del blanco, o al menos del sitio de unión, a nivel atómico. Ésta puede provenir de experimentos de difracción de rayos X con resolución por debajo de 2,5 Å, de experimentos RMN o de modelos por homología de alta identidad. La estructura tridimensional de las moléculas pequeñas puede obtenerse también a partir de datos experimentales (estructuras cristalinas o RMN) o se pueden modelar las conformaciones *de novo*.

En general, el *docking* proteína-ligando no se aplica a toda la superficie proteica, sino que se restringe a un sitio de interés obtenido de información previa proveniente de co-cristales o de programas para la detección de sitios de unión, entre otros.

Para lograr sus objetivos, los programas de *docking* necesitan básicamente dos componentes: (i) un algoritmo de búsqueda eficiente que halle diferentes poses del ligando en relación a la estructura del blanco y (ii) una función de puntaje para estimar la afinidad de cada pose e ir seleccionando las poses energéticamente más favorables.

1.2.2 Algoritmos de búsqueda

El algoritmo de búsqueda es el encargado de explorar de manera efectiva el espacio conformacional disponible para el ligando en el sitio de interés. Dada la enorme cantidad de posibilidades, se usan técnicas heurísticas que permiten hallar poses aceptables en tiempos de simulación acotados. En la gran mayoría de los casos los programas tienen implementados métodos estocásticos como *simulated annealing* (Monte Carlo) ⁴⁴ o algoritmos genéticos ⁴⁵ que operan haciendo cambios aleatorios sobre los grados de libertad conformacionales del ligando. Las poses del ligando que se van obteniendo se evalúan mediante una función de probabilidad predefinida que determina si se mantienen como opción o se eliminan. Los grados de libertad evaluados suelen restringirse a la traslación, rotación y las torsiones de los enlaces. Las distancias y ángulos de enlace permanecen fijas, incluso en anillos alifáticos, de modo de simplificar la búsqueda.

1.2.3 Funciones de puntuación (Scoring functions)

La evaluación precisa de la afinidad de interacción entre los ligandos y sus receptores es de enorme beneficio para el diseño racional.

Este hecho posibilita la predicción de la afinidad de un gran número de compuestos antes de ser sintetizados, agilizando el proceso del desarrollo farmacológico como un todo. Así como también permiten predecir la afinidad de compuestos que ya han sido sintetizados, como una herramienta valiosa para direccionar los ensayos biológicos. Sin embargo, obtener una estimación adecuada de la energía libre de unión de un complejo ligando-proteína es una tarea bastante costosa computacionalmente. De este modo, la necesidad de funciones de evaluación más rápidas, que puedan ser utilizadas por los programas de *docking*, ha llevado al desarrollo de un gran número de funciones que hacen uso de aproximaciones para la valoración del complejo ligando-proteína. Fundamentalmente, las funciones de puntuación están preparadas para predecir modos de unión y

para discriminar entre compuestos que se unen al blanco de aquellos que no, más que para brindar un valor preciso de energía libre de unión.

Las funciones de puntuación se pueden clasificar principalmente en tres grandes grupos: (1) funciones basadas en campos de fuerza, (2) funciones empíricas, y (3) funciones basadas en conocimiento (*knowledge-based*) ⁴⁶. Las funciones basadas en los campos de fuerza diseñados para dinámica molecular como AMBER21 y CHARMM22 calculan las interacciones intermoleculares de Van der Waals y electrostáticas de a pares entre los átomos del ligando y la proteína y, en algunos casos, agregan términos de enlaces de hidrógeno, energía intramolecular del ligando y de solvatación.

1.2.4 Dinámica molecular

La aplicación de dinámica molecular (DM) permite generar configuraciones sucesivas del sistema integrando las leyes del movimiento de Newton. El resultado es una trayectoria que especifica cómo las posiciones y las velocidades de las partículas varían con el tiempo.

Se trata de un método determinista, es decir, las posiciones de los átomos se suceden en la escala temporal y las interacciones entre las partículas son descriptas generalmente por un campo de fuerza.

Existen distintos campos de fuerza aplicados a la DM, entre los más importantes podemos encontrar AMBER, GROMOS y CHARMM, los cuales presentan distintas versiones de acuerdo a las modificaciones que se le fueron realizando a lo largo del tiempo ⁴⁷.

1.3 Sistema muscular humano

El sistema muscular humano es el conjunto de más de 650 músculos del cuerpo, cuya función principal es generar movimiento (**Figura 1.9**) ya sea voluntario o involuntario (músculos esqueléticos y viscerales). El sistema muscular permite que el esqueleto óseo se mueva, mantenga su estabilidad y la forma del cuerpo.



Figura 1.9. Sistema muscular humano.

El sistema muscular está compuesto por tejido contráctil especializado llamado tejido muscular. Los músculos se clasifican en tres grupos:

- o Músculo cardíaco, que forma la capa muscular del corazón (miocardio).
- Músculo liso, que comprende las paredes de los vasos sanguíneos y de los órganos huecos.
- o Músculo esquelético, que se une a los huesos y proporciona movimientos voluntarios.

Basados en su apariencia histológica, los músculos son clasificados en músculos estriados y no estriados; siendo agrupados como estriados el músculo esquelético y el cardíaco, y como no estriado el músculo liso. Los músculos esqueléticos son los únicos que podemos controlar con nuestra propia voluntad ya que están inervados por la parte somática del sistema nervioso. En contraste, el músculo cardíaco y el músculo liso son inervados por el sistema nervioso autónomo, siendo controlados de manera involuntaria por los centros autónomos en nuestro cerebro.

1.3.1 Músculo esquelético

El músculo esquelético es uno de los tejidos más dinámicos del cuerpo humano. En los seres humanos, el músculo esquelético comprende aproximadamente el 40% del peso total del cuerpo, contiene entre el 50-75% de todas las proteínas del cuerpo y representa el 30-50% del recambio proteico total del cuerpo. El músculo está compuesto principalmente por agua (75%), proteínas (20%) y otras sustancias que incluyen sales inorgánicas, minerales, grasas y carbohidratos (5%). En general, la masa muscular depende del equilibrio entre la síntesis y degradación de proteínas, y ambos procesos son sensibles a factores como el estado nutricional, el balance hormonal, la actividad física, lesiones, enfermedades, entre otros. El músculo esquelético contribuye de manera significativa a múltiples funciones corporales ⁴⁸.

Estructuralmente, los músculos esqueléticos están compuestos de células musculares esqueléticas llamadas "miocitos, fibras musculares o miofibrillas". Las fibras musculares son células especializadas cuya característica principal es su habilidad de contraerse. Son células alargadas, cilíndricas, multinucleadas, delimitadas por una membrana celular llamada "sarcolema". El citoplasma de las fibras del músculo esquelético (sarcoplasma) contiene proteínas contráctiles llamadas actina y miosina. Estas proteínas están organizadas en patrones, formando sarcómeros.

Cada fibra muscular está rodeada por una vaina de tejido conectivo laxo llamada *endomisio*. Múltiples fibras musculares están agrupadas en fascículos o haces musculares, que están rodeados por su propia vaina de tejido conectivo llamada *perimisio*. Por último, un grupo de fascículos musculares que forman el músculo está externamente rodeado por otra capa de tejido conectivo llamada de *epimisio* (**Figura 1.10**). Esta capa es continua a otra capa de tejido conectivo llamada *fascia profunda* del músculo esquelético, que separa los músculos de otros tejidos y órganos (no mostrada en la **Figura 1.10**).



Figura 1.10. Estructura del músculo esquelético.

Esta estructura permite que el tejido del músculo esquelético tenga cuatro propiedades fisiológicas principales: excitabilidad (habilidad de detectar el estímulo neuronal), contractilidad (habilidad de contraerse en respuesta al estímulo neuronal), extensibilidad (habilidad de un músculo de ser estirado sin romperse) y elasticidad (habilidad de regresar a su forma normal luego de ser extendido).

Las células satélite, también llamadas *stem cells*, precursoras de las células del músculo esquelético, permanecen en un estado indiferenciado y muestran poca actividad en tejidos maduros, aunque puede ocurrir proliferación de los mioblastos después de la activación de las células satélite por factores miogénicos ⁴⁹. Los mioblastos son células mononucleares indiferenciadas que se dividen y fusionan para generar miocitos multinucleados, precursores de las fibras musculares ^{50,51}.

La línea celular C2C12-CRL 1772 (**Figura 1.11**) son mioblastos obtenidos a partir de un subclon producido en 1985 por H. Blau, *et al.* ⁵² de la línea celular de mioblastos de ratón establecida por D. Yaffe y O. Saxel, es decir que se originaron a partir de la especie de roedor *Mus musculus*. Entre sus características se destacan su morfología fusiforme, su rápida tasa de crecimiento y su capacidad para diferenciarse formando miotubos contráctiles y produciendo proteínas musculares características.



v Density

Figura 1.11. Línea celular C2C12.

Al ser una línea celular derivada de murinos, las células C2C12 presentan la limitación de que pueden no replicar perfectamente la biología del músculo humano. Las diferencias en la expresión génica, el metabolismo celular y las respuestas fisiológicas entre ratones y humanos pueden limitar la aplicabilidad directa de los resultados de la investigación a las condiciones humanas.

Existen muchas patologías que pueden afectar a los músculos. Las enfermedades musculares pueden causar debilidad, dolor o inclusive parálisis. Algunas causas conocidas son: lesiones o exceso de ejercicio (en el caso de torceduras y distensiones, calambres o tendinitis), causas genéticas (distrofia muscular), inflamación (miositis), enfermedades de los nervios que afectan a los músculos, infecciones, cáncer, entre otras.

1.3.2 Rabdomiosarcoma

Entre las patologías más significativas que pueden afectar al músculo esquelético se encuentra el RMS (rabdo: estriado, mio: músculo, sarcoma: tumor maligno). La primera descripción del RMS fue realizada por Weber en 1854⁵³; sin embargo, su publicación "definitiva" es atribuida a Stout en 1946, es decir 92 años después ⁵⁴. En 1854 Weber describió una prolongación localizada en la lengua de un hombre de 21 años, que fue extirpada pero luego reapareció. Estaba formada por células de músculo

estriado en todas las etapas de diferenciación, desde la forma embrionaria hasta la adulta. Aunque Weber no lo llamaba neoplasia, no cabe duda de que se trataba de un RMS. En los años posteriores, se han publicado muchos estudios sobre tumores del músculo estriado; se puede aprender de ellos que se trata de tumores de características macroscópicas, ritmo de crecimiento y apariencia muy variables, que afectan a ambos sexos, a todas las edades (desde el recién nacido hasta el octogenario), que crecen a velocidades enormemente variables y se desarrollan tanto en hombres como en animales ⁵⁴.

El RMS es un tumor maligno que se origina a partir de células mesenquimatosas primitivas que típicamente se diferencian en tejido esquelético. Es una neoplasia rara que puede afectar a personas de todas las edades. Estadísticamente, el RMS es infrecuente en adultos, dado que los sarcomas de tejidos blandos representan menos del 1% de todas las malignidades, y de estos, solo el 3% son RMS. En contraste, los sarcomas de tejidos blandos constituyen el 10% de todas las malignidades en la infancia, de las cuales el 50% son RMS; por lo tanto, el RMS es un problema clínico bien conocido en la oncología pediátrica ⁵⁵.

La inmensa mayoría de casos de RMS ocurren esporádicamente sin que se hayan reconocido factores de riesgo o predisponentes, aunque una pequeña proporción es asociada a condiciones genéticas. Estas condiciones incluyen el síndrome de Li-Fraumeni con mutaciones en el gen *p53* ⁵⁶, la neurofibromatosis, y el síndrome de Beckwith-Wiedemann ⁵⁷.

La clasificación de la Organización Mundial de la Salud en 2020 distingue cuatro subtipos histológicos de RMS: embrionario, alveolar, de células fusiformes o esclerosante y pleomórfico ^{58,59}.

- <u>RMS embrionario</u>: es el tipo más común de RMS. Se presenta más a menudo en el área de la cabeza y el cuello, o en los órganos genitales y urinarios, pero puede surgir en cualquier parte del cuerpo. En la mayoría de los casos, se trata de varones. La incidencia máxima se presenta en niños entre 0 y 4 años, con casi 4 casos por millón de niños. La tasa de incidencia es inferior en adolescentes, casi 1.5 casos por millón de adolescentes. Está asociado con un mejor pronóstico ^{59,60}.
- <u>RMS alveolar</u>: este tipo se presenta más a menudo en los brazos o las piernas, el tórax, el abdomen, los órganos genitales o el área anal. La incidencia del RMS alveolar no varía según el sexo, se distribuye de manera uniforme a lo largo de la infancia y la adolescencia (la mitad de los casos ocurren después de los 10 años); alrededor de 1 caso por millón de niños y adolescentes. ^{59,60}.
- <u>RMS de células fusiformes o esclerosante</u>: este tipo de RMS se presenta más a menudo en el área paratesticular (es decir, testículos o cordón espermático). El RMS de células fusiformes o

esclerosante se considera dentro de la misma categoría diagnóstica. Esta variante infrecuente representa del 3% al 10% de todos los casos ⁵⁹.

 <u>RMS pleomórfico</u>: es el tipo menos común en los niños. El RMS pleomórfico es un sarcoma pleomórfico de grado alto observado en adultos. Los casos en niños se consideran RMS con anaplasia difusa ⁵⁹.

Dentro de los subtipos de RMS descriptos, se consideran dos como relevantes: el alveolar que tiene mal pronóstico por ser más agresivo y el RMS embrionario, que tiene mejores resultados en sus tratamientos y mayor incidencia en niños menores de 10 años ⁵⁵. Los pacientes con el subtipo embrionario muestran las tasas de supervivencia más altas, mientras que aquellos con subtipos pleomórficos y alveolares tienen las tasas de supervivencia más bajas. El tamaño del tumor, el grado y la presencia de metástasis fueron predictivos de la supervivencia ⁶¹.

Las terapias contra el RMS no han sido actualizadas en los últimos 30 años e incluyen las tradicionales sesiones de quimioterapia y radioterapia. Estas terapias, además de no ser específicas, tienen numerosos efectos secundarios y dejan secuelas importantes en los pacientes jóvenes, acortando drásticamente su expectativa de vida y aumentando la posibilidad de desarrollar otro tumor, ya sea del mismo tipo o diferente ⁵⁵. Por este motivo, es crucial identificar *target*s moleculares para desarrollar terapias más específicas y menos agresivas.

En conclusión, la necesidad de mejorar las terapias actuales para el RMS es evidente. La supervivencia de los pacientes con RMS ha mejorado, especialmente en la última década, principalmente debido a los enfoques interprofesionales en el manejo de la enfermedad. Esta Tesis Doctoral destaca la importancia de esos enfoques y el manejo multidisciplinario para avanzar en el tratamiento de esta enfermedad.

En el marco de este Trabajo de Tesis Doctoral, también se empleó la línea celular RD CCL-136 de RMS embrionario humano, obtenida a partir de biopsias de una niña caucásica de 7 años. Se pueden observar al microscopio óptico como células grandes, multinucleadas y en forma de huso, tal como ilustra en la **Figura 1.12**.



Figura 1.12. Línea celular RD.

1.4 Vías de señalización intracelulares

Varios factores y vías de señalización moleculares intracelulares regulan la masa muscular y la hipertrofia de este tejido. La hipertrofia muscular es el aumento en el tamaño de un músculo o su área de sección transversal atribuida a un aumento en el tamaño y/o número de miofibrillas.

Las vías de señalización intracelulares se activan después de una serie de ejercicios de resistencia en jóvenes y adultos. Existen dos vías de señalización con un rol importante: en una de esas vías, la hipertrofia de los miotubos inducida por el factor 1 de crecimiento dependiente de insulina (IGF-1), depende de otra vía iniciada por fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3K) y la quinasa Akt, que a su vez conduce a la activación de la quinasa sensible a rapamicina conocida como mTOR, que regula factores tales como p70^{S6K} y PHAS-1/4E-BP1 que han demostrado incrementar la síntesis de proteínas a través de aumentos en la iniciación y elongación de la traducción ⁶². En la segunda vía, la miostatina, un miembro de la superfamilia de TGF-β, actúa como un regulador negativo de la masa muscular. Las mutaciones en el gen de la miostatina o un bloqueo en su vía de señalización resultan en hipertrofia muscular. Varios micro ARN's han sido identificados como participantes importantes en la regulación de la masa muscular por intervenir en estas dos vías de señalización ^{48,63}.

La regulación del músculo esquelético es compleja e involucra una coordinación precisa de varias vías de señalización intracelulares.

1.4.1 Vía PI3K/PDK1/Akt

Estudios utilizando manipulación genética y farmacológica en células y modelos de roedor han identificado a Akt, también llamada proteína quinasa B (PKB), una serina/treonina quinasa como un punto clave en la hipertrofia ⁶² y en las vías de señalización de atrofia ^{64,65}.

Las vías de señalización de PI3K/PDK1/Akt y mTOR son cruciales para muchos aspectos del crecimiento y la supervivencia celular, tanto en condiciones fisiológicas como patológicas. Están tan interconectados que, en cierto sentido, podrían considerarse como una vía única que a su vez interactúa en gran medida con muchas otras vías, como la del factor inducible por hipoxia (HIF). La vía PI3K/PDK1/Akt es un regulador clave de la supervivencia durante el estrés celular, y en los tumores existe un entorno intrínsecamente estresante (caracterizado por un limitado suministro de nutrientes y oxígeno, así como por un pH bajo), por lo que ésta compleja vía se ha considerado como uno de los objetivos más atractivos para el desarrollo de agentes anticancerígenos ^{66,67}.

La vía de señalización PI3K/PDK1/Akt juega un papel fundamental en la proliferación, diferenciación, apoptosis, autofagia y supervivencia, y también controla funciones como el metabolismo y la locomoción ^{66,68}. La activación/inhibición de esta vía de señalización se ha estudiado para regular la supervivencia de células cancerosas humanas *in vitro*, así como la carcinogenicidad, invasión y metástasis de células cancerosas humanas *in vivo* ⁶⁹.

Uno de los objetivos de estudio de nuestro grupo de investigación es la proteína quinasa Akt ^{4,70}. La serina y treonina quinasa Akt fue descubierta hace poco más de 30 años y ha sido el foco de decenas de miles de estudios en diversos campos de la biología y la medicina ^{71,72}. Esta quinasa posee tres isoformas: Akt1, Akt2 y Akt3; con implicaciones claves en la proliferación, supervivencia, diferenciación y viabilidad de las células musculares ^{73–75}. Por otro lado, PI3K cuenta además con dos subunidades, una de 85 kD y otra de 110 kD (p85 y p110) ⁷⁶.

Akt está regulada por la previa activación de PI3K en respuesta a factores de crecimiento. PI3K activada fosforila el fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PIP₂) para generar fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP₃). La unión del dominio de homología de pleckstrina N-terminal de Akt con PIP₃ permite que Akt se transloque a la membrana plasmática. El dominio de homología de pleckstrina (dominio PH), es un dominio de proteína de aproximadamente 120 aminoácidos que se encuentra en una amplia gama de proteínas involucradas en la señalización intracelular o como constituyentes del citoesqueleto. Este dominio puede unir lípidos de fosfatidilinositol dentro de las membranas biológicas (como el PIP₂ y el PIP₃), y proteínas como las subunidades β y de las proteínas G heterotriméricas y la proteína quinasa C. A través de estas interacciones, los dominios PH juegan un papel en el reclutamiento de proteínas en

diferentes membranas, dirigiéndolas a los compartimentos celulares apropiados o permitiéndoles interactuar con otros componentes de las vías de transducción de señales.

Una vez que Akt es anclada a la membrana plasmática, la quinasa-1 dependiente de 3-fosfoinositido (PDK1) fosforila Akt en Thr308 en el dominio quinasa (T-loop) y luego PDK1 o PDK2 (también llamado mTORC2) fosforila su residuo Ser473 dentro del motivo hidrofóbico (HM) en la cola C-terminal, promoviendo la activación completa de Akt, este paso es necesario para aumentar aún más su actividad, desencadenando la señalización posterior (**Figura 1.13** y **Figura 1.14**) ⁶⁶. Por lo que, los anticuerpos específicos contra fosfo-Ser473 de Akt sólo reconocen Akt activa ⁷⁷. Después de que Akt se fosforila en ambos residuos (Thr308 y Ser473), ejecuta diversas acciones biológicas al fosforilar una variedad de proteínas intracelulares *downstream*, como los miembros de la familia FoxO, GSK-3β y mTOR, entre otros ⁷⁷⁻⁷⁹.



Figura 1.13. Vía de señalización PI3K/PDK1/Akt.



Figura 1.14. Vía de señalización PI3K/PDK1/Akt (Weinberg, 2014).

Debido a su capacidad para fosforilar Akt, PDK1 ha sido implicada en numerosas funciones biológicas como la proliferación, diferenciación, apoptosis, invasión y motilidad celular ⁸⁰, y juega un papel crucial en el cáncer ⁸¹ y en particular en RMS ⁸².

Dadas las funciones intracelulares de Akt como punto clave de las vías de señalización implicadas en el crecimiento celular, proliferación, apoptosis y neoangiogénesis, la inhibición de la cascada de señalización de Akt se considera un potente agente anticancerígeno ⁸³. Para varios tipos de cáncer, los estudios preclínicos han demostrado que los inhibidores de PI3K/PDK1/Akt tienen respuestas prometedoras a mutaciones en la subunidad catalítica alfa PI3K (PIK3Ca) y la deficiencia del homólogo de fosfato y tensina (PTEN) ^{84,85}. PTEN se encuentra frecuentemente mutado en cánceres humanos avanzados. El principal sustrato lipídico de PTEN es PIP₃ y, de hecho, PTEN actúa como un regulador negativo de la señalización PI3K/PDK1/Akt ⁸⁶. Por lo tanto, la pérdida de actividad de PTEN conduce a la activación permanente de la vía PI3K/PDK1/Akt ⁶⁶.

Se sabe que la desregulación de la vía PI3K/PDK1/Akt/mTOR impulsa el desarrollo y la progresión del cáncer ⁸⁷. De hecho, la aberración de esta vía ocurre en aproximadamente el 50% de los tumores, y es la vía más comúnmente activada en el cáncer humano.

La familia MAPK comprende una cascada formada por una serie de quinasas que actúan sucesivamente y que da como resultado la fosforilación y activación de quinasas terminales, entre las que podemos encontrar p38, quinasas N-terminales c-Jun y ERK 1/2⁸⁸.

Tanto la vía de PI3K/PDK1/Akt como también MAPK/ERK1/2 son muy importantes en la cascada de transducción de señales que regulan el crecimiento, proliferación, supervivencia, apoptosis, movilidad e invasión celular ⁸⁹. La proteína quinasa c-Raf que es activada por RAS, fue identificada como uno de los primeros sustratos de Akt, que inicia una cascada que culmina en la activación de ERK1/2 ⁹⁰.

1.4.2 Inhibidores de PI3K/PDK1/Akt

La primera generación de inhibidores de PI3K incluía compuestos como Wortmanina (un metabolito natural de *Penicillium funiculosum*) y LY294002 (deriva del flavonoide quercetina), que podían unirse a todas las PI3K de clase I, por lo que se denominaron "pan-inhibidores" ^{66,91}.

El inhibidor LY294002, como se explicó previamente, es un compuesto químico sintético comercial que contiene morfolina y es conocido por ser un potente inhibidor entre otras proteínas, de PI3K ^{92–94}. LY294002 no solo se une a PI3K de clase I y otras quinasas relacionadas con PI3K, sino también a nuevos objetivos aparentemente no relacionados con la familia PI3K ⁴¹, por lo que LY294002 es un

inhibidor no selectivo y no debería utilizarse en experimentos con el objetivo de apuntar a Akt únicamente ⁹⁵.

Se ha documentado el potencial antineoplásico de un inhibidor relativamente nuevo de PI3K/Akt, llamado GDC-0941 o 2-(1H-Indazol-4-il)-6-(4-metansulfonil-piperazin-1-ilmetil)-4-morpholin-4iltieno[3,2-d]pirimidina, para el tratamiento del meduloblastoma, *in vitro* e *in vivo* ⁹⁶. En particular, los resultados de un metaanálisis de 46 ensayos controlados aleatorios han demostrado que las terapias basadas en inhibidores de la vía PI3K/PDK1/Akt/mTOR mejoran significativamente la supervivencia de pacientes con tumores sólidos avanzados ⁹⁷. Además, el inhibidor de PDK1 recientemente desarrollado, GSK2334470, se probó en células C2C12 demostrando el papel de PDK1 en la función del músculo esquelético ⁹⁸. En vista de esto, los inhibidores de PI3K/PDK1/Akt han adquirido gran relevancia para la medicina humana. Aunque existen compuestos comerciales que inhiben la cascada PI3K/PDK1/Akt sin causar efectos citotóxicos en las células normales, dichos compuestos son fotosensibles y no completamente específicos.

La línea celular C2C12 es un buen modelo para investigar el proceso de proliferación celular y las vías de transducción de señales que ocurren en células no cancerosas, debido a su fácil crecimiento en cultivo, alta versatilidad y posibilidad de diferenciación *in vitro*. En estas células, Akt es una diana de PI3K y el inhibidor LY294002 suprime con éxito la fosforilación de Ser-473 de Akt ⁹¹. Además, PDK1 está involucrado en la activación de Akt en células C2C12 ⁹⁹.

Dentro de las terapias dirigidas contra el RMS, se buscan aquellas que inhiban la hiperproliferación celular y la diseminación (metástasis), y que promuevan la apoptosis de las células tumorales. En particular, es relevante investigar las acciones de diversos compuestos en vías de señalización clave, como la vía de PI3K/PDK1/Akt, que es crucial en la regulación de la proliferación, diferenciación, supervivencia y apoptosis celular. Debido a que estos procesos se encuentran desregulados en las células cancerosas, la regulación de esta ruta se postula como un aspecto central en el desarrollo de fármacos anticancerígenos.

Una estrategia interesante aplicada al descubrimiento de nuevos fármacos consiste en el uso de "estructuras privilegiadas", como se mencionó anteriormente. En años recientes, el desarrollo de derivados de acridona como candidatos eficaces de drogas anticáncer ha atraído una atención considerable ^{100–102}. Considerando la experiencia de nuestro grupo de investigación en el diseño, síntesis y ensayos biológicos de heterociclos tricíclicos fusionados ^{3,7,103,104}, aquí se investiga la síntesis y acción biológica de nuevos prometedores inhibidores de Akt basados en entidades químicas derivadas de la estructura de acridona y xantona.

CAPÍTULO 2: OBJETIVOS

2.1 El Objetivo General de esta Tesis Doctoral fue:

 Δ Sintetizar estructuras heterocíclicas fusionadas y evaluar sus efectos como posibles inhibidores de PI3K/PDK1/Akt en células de músculo esquelético no cancerosas y en RMS.

2.2 Objetivos específicos

- Desarrollar cultivos bidimensionales de células de músculo esquelético normales y de RMS.
- Diseñar y sintetizar andamiajes heterocíclicos basados en las "estructuras privilegiadas" derivadas de acridona y xantona.
- Elucidar la estructura de los nuevos heterociclos funcionalizados mediante la aplicación de distintas técnicas espectroscópicas tales como IR, RMN y CG-EM.
- Determinar los efectos de los candidatos a inhibidores, estudiando la acción a distintas dosis y a diferentes tiempos de exposición sobre la vía PI3K/PDK1/Akt en células de RMS y de músculo esquelético normal.

CAPÍTULO 3: SECCIÓN EXPERIMENTAL

3.1 Materiales y métodos: Sección química

A menos que se indique lo contrario, los reactivos se obtuvieron comercialmente y se usaron sin purificación adicional. Los solventes se secaron y destilaron de acuerdo con el procedimiento estándar ¹⁰⁵. Las reacciones se monitorearon mediante TLC en placas de gel de sílice (60F-254) visualizadas bajo luz UV y/o utilizando ácido fosfomolíbdico al 5% en etanol.

Todos los espectros de RMN de ¹H y ¹³C se registraron a temperatura ambiente en CDCl₃ o DMSO- d_6 en un espectrómetro Bruker Avance ARX-300. Los desplazamientos químicos (δ) se informan en partes por millón (ppm) desde el TMS utilizando la resonancia del solvente residual. Se utilizaron abreviaturas estándar para denotar multiplicidades como se denota: s = singulete, d = doblete, t = triplete, q = cuarteto (*quartet*), m = multiplete, br s = señal ancha (*broad signal*).

Los espectros IR se registraron en un espectrofotómetro FT-IR Nicolet Nexus 470/670/870 a temperatura ambiente.

Los puntos de fusión se determinaron utilizando un aparato Büchi 510 y no están corregidos.

Los espectros de masas se obtuvieron a 70 eV en un instrumento HP-5890 CG-EM de Hewlett Packard equipado con un detector de masas selectivo HP-5972.

Los espectros de masas de alta resolución se registraron en Thermo Fisher LTQ Orbitrap XL.

3.1.1 Derivados de Acridona

En el grupo de investigación SINTOM (Síntesis Orgánica Medicinal), liderado por el Dr. Darío C. Gerbino (INQUISUR, CONICET-UNS), se ha llevado a cabo el diseño y síntesis de seis nuevos y promisorios inhibidores de Akt basados en el andamiaje 10*H*-acridin-9-ona, denominados **AC4MOR (3a)**, **AC5DIE (3b)**, **AC5MOR (3c)**, **AC5PIR (3d)**, **AC5PIP (3e)** y **AC6MOR (3f)**. En función de los resultados de los ensayos biológicos desarrollados en el grupo de investigación BioME (Biología del Músculo Esquelético), liderado por la Dra. Claudia G. Buitrago (INBIOSUR, CONICET-UNS), se pudo determinar el efecto diferencial que producen las distintas modificaciones que se introducen al núcleo base de acridona.

La secuencia general de reacciones para la obtención de los derivados de acridona de tipo **3** se ilustra en el **Esquema 3.1**.

CAPÍTULO 3: SECCIÓN EXPERIMENTAL



Esquema 3.1. Procedimiento general de síntesis de los derivados de acridona. Condiciones de reacción: (i) ZnCl₂, *n*-BuOH anhidro a reflujo, (ii) Br(CH₂)_nBr, K₂CO₃ (2 eq), acetona seca a reflujo, (iii) amina, DMF seco, temperatura ambiente.

3.1.1.1 Síntesis de 1,3-dihidroxiacridona (1,3-DHA) (1).

Basándonos en la reacción de síntesis de Hari *et al.* en 2010¹⁰⁶. Bajo atmósfera de argón, se colocó la siguiente mezcla (**Esquema 3.2**):

- Ácido antranílico: 6.86 g, 50.00 mmol.
- Floroglucinol: 6.31 g, 50.00 mmol.
- ✤ ZnCl₂ anhidro: 6.95 g, 51.00 mmol.
- ✤ n-butanol anhidro: 150 ml, a reflujo.
- Tiempo de reacción: 24 horas.



Esquema 3.2. Síntesis de 1,3-DHA a partir de ácido antranílico y floroglucinol. Condiciones de reacción: (i) ZnCl₂, *n*-BuOH anhidro a reflujo.

El progreso de la reacción fue monitoreado por cromatografía en capa fina (TLC). La mezcla fue enfriada, diluida con una mezcla de benceno-agua (1:1, 100 ml), la capa orgánica fue separada y secada sobre Na_2SO_4 anhidro. La eliminación de solventes bajo presión reducida dejó una masa aceitosa que fue disuelta en NaOH caliente y acuoso (5%, 500 ml) para que los restos de ácido antranílico y floroglucinol pasen a la fase acuosa y así se separen del sólido; luego la mezcla fue filtrada. Al acidificar el filtrado con H_2SO_4 diluido (5%), proporcionó el producto deseado. El producto crudo fue luego purificado por cromatografía en columna utilizando gel de sílice 60 con éter de petróleo:acetato de etilo (50:50) para obtener **(1)** (7.95 g, 35 mmol, 70%) como un sólido amarillo.

Caracterización del compuesto **(1)** o 1,3-DHA: Preparado a partir de ácido antranílico y floroglucinol. Punto de fusión: > 300°C.

¹H-RMN (300 MHz, DMSO- d_6): δ 6.04 (d, J = 1.2 Hz, 1H, Ar-H), 6.26 (d, J = 0.6 Hz, 1H, Ar-H), 7.22 (t, J = 7.5 Hz, 1H, Ar-H), 7.43 (d, J = 9.0 Hz, 1H, Ar-H), 7.68 (t, J = 7.8, 7.2 Hz, 1H, Ar-H), 8.12 (d, J = 8.4 Hz, 1H, Ar-H), 10.55 (s, 1H, NH), 11.72 (s, 1H, OH), 14.28 (s, 1H, OH). Ver **Anexo, Figura 1**.

¹³C-RMN (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ 91.8, 96.6, 104.3, 117.8, 119.8, 122.1, 126.0, 134.6, 141.7, 144.3, 164.7, 165.2, 180.9.

IR (KBr) v [cm⁻¹] = 3440 (N-H), 3165, 3076, 1645 (C=O), 1609, 1458, 1183, 827. Ver Anexo, Figura 2.

HRMS (EI) m/z: 227.0582 calculado para C₁₃H₉NO₃, encontrado 227.0585.

3.1.1.2 Procedimiento general para la síntesis de 3-(*n*-bromoalcoxi)-1-hidroxiacridin-9(10*H*)-onas (2a-2c).

Bajo atmósfera de argón, se preparó la siguiente mezcla de reacción (Esquema 3.3):

- ✤ 1,3-DHA: 1.00 g, 4.40 mmol.
- ✤ K₂CO₃: 1.20 g, 8.80 mmol.
- ✤ Acetona seca: 2 ml.
- ✤ 1,n-dibromoalcano: 8.80 mmol, n = 4-6. Se añadió lentamente con la ayuda de una jeringa.
- Tiempo de reacción: 24 horas.
- Atmósfera de argón.



Esquema 3.3. Síntesis de 3-(*n*-bromoalcoxi)-1-hidroxiacridin-9(10*H*)-onas **(2a-2c)**. Condiciones de reacción: (i) $Br(CH_2)_n Br$, K_2CO_3 (2 eq), acetona seca a reflujo.

La mezcla de reacción se agitó a reflujo y se monitoreó su progreso mediante TLC. El sólido amarillo resultante se recolectó por filtración, se lavó con acetona (30 ml), se secó al aire y el producto crudo se purificó por cromatografía en columna utilizando gel de sílice 60. Los compuestos **2a-2c** se eluyeron como sólidos amarillos con éter de petróleo:acetato de etilo.
3.1.1.2.1 Síntesis de 3-(4-bromobutoxi)-1-hidroxiacridin-9(10H)-ona (2a).



Figura 3.4. Compuesto 2a.

Ver **Figura 3.4**. Sólido aislado: 82% (1.31 g, 3.61 mmol), sólido color amarillo pálido. Sintetizado a partir de 1,3-DHA y 1,4-dibromobutano.

Punto de fusión: 146-147 °C.

¹H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ 1.81-1.93 (m, 2H, CH₂), 1.93-2.03 (m, 2H, CH₂), 3.61 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H, CH₂-Br), 4.11 (t, *J* = 5.9 Hz, 2H, CH₂-O), 6.20 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H, Ar-H), 6.43 (d, *J*=2.2 Hz, 1H, Ar-H), 7.34 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H, Ar-H), 7.55 (d, *J*= 8.3 Hz, 1H, Ar-H), 7.70-7.80 (m, 1H, Ar-H), 8.23 (d, *J*= 8.5 Hz, 1 H, Ar-H), 12. 01 (s, 1H, NH), 14,26, (s,1H, OH). Ver **Anexo, Figura 3**.

¹³C-RMN (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ 27.72, 29.48, 35.26, 67.54, 91.3, 96.1, 103.7, 117.3, 119.3, 121.6, 125.5, 134.1, 141.2 143.8, 164.1, 164.7, 180.4.

IR (KBr) v [cm⁻¹] = 3445 (N-H), 2966, 1654 (C=O), 1620, 1471, 1171, 818. Ver Anexo, Figura 4.

HRMS (EI) m/z: 361.0314 calculado para $C_{17}H_{16}BrNO_3$, encontrado 361.0318.

3.1.1.2.2 Síntesis de 3-((5-bromopentil)oxi)-1-hidroxiacridin-9(10H)-ona (2b).



Figura 3.5. Compuesto 2b.

Ver **Figura 3.5**. Sólido aislado: 73% (1.21 g, 3.21 mmol), sólido color amarillo pálido. Sintetizado a partir de 1,3-DHA y 1,5-dibromopentano.

Punto de fusión: 195-197 °C.

¹H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ 1.47-1.60 (m, 2H, CH₂), 1.72-1.79 (m, 2H, CH₂), 1.70-1.81 (m, 2H, CH₂), 1.84-1.93 (m, 2H, CH₂-Br), 4.07 (t, J = 7.0 Hz, 2H, CH₂-O), 6.13 (d, J = 2.3 Hz, 1H, Ar-H), 6.37 (d, J = 2.0 Hz, 1H, Ar-H), 7.28 (t, J = 7.4 Hz, 1H, Ar-H), 7.49 (d, J = 8.4 Hz, 1H, Ar-H), 7.74 (t, J = 7.9 Hz, 1H, Ar-H), 8.16 (d, J = 8.0 Hz, 1H, Ar-H), 11.95 (s, 1H, NH), 14.20 (s, 1H, OH). Ver **Anexo, Figura 5**.

¹³C-RMN (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ 25.3, 28.6, 32.9, 36.1, 68.8, 90.72, 95.84, 104.97, 118.03, 119.96, 122.5, 126.1, 135.1, 141.8, 144.2, 164.5, 165.7, 181.3. Ver **Anexo, Figura 6**.

IR (KBr) v [cm⁻¹]: 3443 (N-H), 2961, 1654 (C=O), 1620, 1472, 1173, 818.

HRMS (EI) m/z: 375.0470 calculado para C₁₈H₁₈BrNO₃, encontrado 375.0473.

3.1.1.2.3 Síntesis de 3-((6-bromohexil)oxi)-1-hidroxiacridin-9(10H)-ona (2c).



Figura 3.6. Compuesto 2c.

Ver **Figura 3.6**. Sólido aislado: 70% (1.20 g, 3.08 mmol), sólido color amarillo pálido. Obtenido a partir de 1,3-DHA y 1,6-dibromohexano.

Punto de fusión: 178-179 °C.

¹H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ 1.36-1.49 (m, 6H, CH₂), 1.75-1.81 (m, 2H, CH₂), 3.52 (t, *J* = 7.9 Hz, 2H, CH₂-Br), 4.09 (t, J = 7.0 Hz, 2H, CH₂-O), 6.13 (d, J = 2.0 Hz, 1H, Ar-H), 6.37 (d, J = 2.0 Hz, 1H, Ar-H), 7.28 (t, J = 8.0 Hz, 1H, Ar-H), 7.48 (d, J = 8.19 Hz, 1H, Ar-H), 7.73 (t, J = 6.5 Hz, 1H, Ar-H), 8.16 (d, J = 8.7 Hz, 1H, Ar-H), 11.95 (s, 1H, NH), 14.27 (s, 1H, OH). Ver **Anexo, Figura 7**.

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃): δ 26.3, 27.4, 27.8, 29.3, 32.5, 68.7, 90.2, 95.9, 105.2, 116.4, 118.4, 120.6, 126.6, 134.17, 140.7, 143.2, 164.9, 165.95, 181.7. Ver **Anexo, Figura 8**.

IR (KBr) v [cm⁻¹]: 3442 (N-H), 2946, 1653 (C=O), 1573, 1481,1179, 819.

HRMS (EI) m/z: 389.0627 calculado para $C_{19}H_{20}BrNO_3$, encontrado 389.0632.

3.1.1.3 Procedimiento general para la síntesis de 3-(*n*-aminoalcoxi)-1-hidroxiacridin-9(10*H*)-onas (3a-3f)

Bajo atmósfera de argón, se preparó una solución de (Esquema 3.7):

- ✤ 2a-2c: 1.00 mmol
- Amina secundaria correspondiente (dietilamina, morfolina, pirrolidina, piperidina): 2.50 mmol.
- DMF seco.
- Temperatura ambiente.
- Tiempo de reacción: 24-48 horas.



Esquema 3.7. Síntesis de 3-(*n*-aminoalcoxi)-1-hidroxiacridin-9(10*H*)-onas **(3a-3f)**. Condiciones de reacción: (i) amina, DMF seco, temperatura ambiente.

La solución se agitó hasta completar la reacción. Su progreso se monitoreó mediante TLC. La mezcla de reacción se diluyó con agua y se extrajo con acetato de etilo. La capa orgánica se separó y se secó sobre Na₂SO₄ anhidro. La eliminación del solvente bajo presión reducida condujo a los compuestos **3a-3f** respectivamente, sin necesidad de una purificación adicional.

3.1.1.3.1 Síntesis de 1-hidroxi-3-(4-morfolinobutoxi)acridin-9(10H)-ona (3a).



Figura 3.8. Compuesto AC4MOR (3a).

Ver **Figura 3.8**. Sólido aislado: 91% (0.34 g, 0.91 mmol), sólido color amarillo. Obtenido a partir del compuesto **2a** y morfolina.

Punto de fusión: 185-189 °C.

¹H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ 1.56-1.66 (m, 2H, CH₂), 1.73-1.85 (m, 2H, CH₂), 2.32-2.36 (m, 6H, CH₂-N), 3.55 (t, 4H, CH₂-O), 4.08 (t, J = 4.6 Hz, 2H, CH₂-O), 6.17 (d, J = 2.0 Hz, 1H, Ar-H), 6.38 (d, J = 2.0 Hz,

1H, Ar-H), 7.30 (t, J = 7.4 Hz, 1H, Ar-H), 7.51 (d, J = 8.3 Hz, 1H, Ar-H), 7.73-7.80 (m, 1H, Ar-H), 8.19 (dd, J = 1.2, 1.3 Hz 1H, Ar-H), 11.96 (s, 1H, NH), 14.23 (s, 1H, OH). Ver **Anexo, Figura 9**.

¹³C-RMN (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ 23.2, 27.4, 54.2, 58.7, 67.1, 68.7, 90.6, 95.7, 104.8, 117.9, 119.8, 122.4, 126.0, 134.9, 141.7, 144.1, 164.4, 165.6, 181.2. Ver **Anexo, Figura 10**.

IR (KBr) v [cm⁻¹]: 3440 (N-H), 2959, 1655 (C=O), 1573, 1481, 1163, 819.

HRMS (EI) m/z: 368.1736 calculado para $C_{21}H_{24}N_2O_4$, encontrado 368.1739.

3.1.1.3.2 Síntesis de 3-((5-(dietilamino)pentil)oxi)-1-hidroxiacridin-9(10H)-ona (3b).



Figura 3.9. Compuesto AC5DIE (3b).

Ver **Figura 3.9**. Sólido aislado: 96% (0.35 g, 0.96 mmol), sólido color amarillo. Obtenido a partir del compuesto **2b** y dietilamina.

Punto de fusión: 180-181 °C.

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 1.06 (t, J= 7.0 Hz, 6H, CH₃), 1.45-1.57 (m, 4H, CH₂), δ 2.46-2.51 (m, 2H CH₂-N), 2.48 (t, J = 7.0 Hz, 2H, CH₂-N), 2.51-2.64 (m, 4H, CH₂-N), 4,01 (t, J= 7.2 Hz, 2H, CH₂-O), 6.23-6.35 (m, 2H, Ar-H), 7.61-7.63 (m, 2H, Ar-H), 7.48 (d, J = 8.3 Hz, 1H, Ar-H), 8.35 (d, J = 8.0, 1H, Ar-H), 8.58 (s, 1H, NH), 14.04 (s, 1H, OH). Ver **Anexo, Figura 11**.

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃): δ 11.5, 24.1, 26.8, 29.1, 47.1, 53.0, 68.3, 89.9, 95.8, 105.0, 116.2, 120.4, 122.0, 126.5, 133.9, 140.5, 142.9, 164.8, 165.7, 181.5. Ver **Anexo, Figura 12**.

IR (KBr) v [cm⁻¹]: 3442 (N-H), 2948, 1651 (C=O), 1450, 1163, 819.

HRMS (EI) m/z: 368.2100 calculado para C₂₂H₂₈N₂O₃, encontrado 368.2104.

3.1.1.3.3 Síntesis de 1-hidroxi-3-((5-morfolinopentil)oxi)acridin-9(10H)-ona (3c).



Figura 3.10. Compuesto AC5MOR (3c).

Ver **Figura 3.10**. Sólido aislado: 91% (0.35 g, 0.91 mmol), sólido color amarillo. Obtenido a partir del compuesto **2b** y morfolina.

Punto de fusión: 185-186 °C.

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 1.45-1.64 (m, 4H, CH₂), 1.78-1.83 (m, 2H, CH₂), 2.42 (t, J = 7.0 Hz, 2H, CH₂-N), 2.48-2.55 (m, 4H, CH₂-N), 3.77 (t, J = 4.7 Hz, 4H, CH₂-O), 3.99 (t, J = 6.4 Hz, 2H, CH₂-O), 6.14-6.24 (m, 2H, Ar-H), 7.10-7.30 (m, 2H, Ar-H), 7.57-7.71 (m, 1H, Ar-H), 8.34 (d, J = 8.0 Hz, 1H, Ar-H), 8.58 (s, 1H, NH), 14.04 (s, 1H, OH). Ver **Anexo, Figura 13**.

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃): δ 11.51, 24.1, 26.8, 29.1, 47.1, 53.0, 68.2, 89.9, 95.7, 105.0, 116.1, 121.9, 126.4, 133.9, 139.2, 142.9, 142.8, 164.8, 165.6, 181.5. Ver **Anexo, Figura 14**.

IR (KBr) v [cm⁻¹] = 3461 (N-H), 2957, 1653 (C=O), 1471, 1163, 819.

HRMS (EI) m/z: 382.1893 calculado para $C_{22}H_{26}N_2O_4$, encontrado 382.1896.

3.1.1.3.4 Síntesis de 1-hidroxi-3-((5-(pirrolidin-1-il)pentil)oxi)acridona (3d).



Figura 3.11. Compuesto AC5PIR (3d).

Ver **Figura 3.11**. Sólido aislado: 96% (0.35 g, 0.96 mmol), sólido color amarillo. Obtenido a partir de **2b** y pirrolidina.

Punto de fusión: 123-124 °C.

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 1.41-1.54 (m, 2H, CH₂), 1.55-1.67 (m, 2H, CH₂), 1.72-1.89 (m, 6H, CH₂), 2.45-2.64 (m, 6H, CH₂-N), 2.95 (t, 2H, CH₂-O), 3.95 (t, *J* = 6.5, 2H, Ar-H), 6.15 (s, 1H, Ar-H), 6.20 (s, 1H,

Ar-H), 7.62 (t, *J* = 7.0 Hz, 1H, Ar-H), 8.31 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, Ar-H) 8.95 (s, 1H, NH), 14.09 (s, 1H, OH). Ver **Anexo, Figura 15**.

¹³C-RMN (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ 22.8, 23.1, 26.8, 28.2, 53.3, 54.8, 67.7, 89.5, 94.7, 103.8, 116.9, 118.8, 121.3, 125.0, 133.8, 140.7, 143.1, 163.4, 164.6, 180.1. Ver **Anexo, Figura 16**.

IR (KBr) v [cm⁻¹] = 3461 (N-H), 2965, 1652 (C=O),1447, 1163, 862.

3.1.1.3.5 Síntesis de 1-hidroxi-3-((5-(piperidin-1-il)pentil)oxi)acridona (3e).



Figura 3.12. Compuesto AC5PIP (3e).

Ver **Figura 3.12**. Sólido aislado: 93% (0.35 g, 0.93 mmol), sólido color amarillo. Obtenido a partir de **2b** y piperidina.

Punto de fusión: 127-128 °C.

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 0.51-0.98 (m, 2H, CH₂), 1.17-1.23 (m, 4H, CH₂), 1.64-1.94 (m, 6H, CH₂), 2.36-2.50 (m, 6H, CH₂-N), 4.03 (t, J = 6.0 Hz, 2H, CH₂-O), 5.90-5.95 (m, 2H, Ar-H), 6.12-6.27 (m, 2H, Ar-H), 7.58-7.68 (m, 1H, Ar-H), 8.35 (d, J = 8.0 Hz, 1H, Ar-H), 8.47 (s, 1H, NH), 14.02 (s, 1H, OH). Ver **Anexo**, **Figura 17**.

¹³C-RMN (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ 23.4, 24.0, 25.4, 25.8, 28.3, 53.9, 58.3, 67.8, 89.5, 94.7, 103.8, 116.9, 118.9, 121.3, 125.0, 133.8, 140.7, 143.1, 163.4, 164.6, 180.2. Ver **Anexo, Figura 18**.

IR (KBr) v [cm⁻¹] = 3451 (N-H), 2965, 1652 (C=O),1447, 1163, 861.

3.1.1.3.6 Síntesis de 1-hidroxi-3-((6-morfolinohexil)oxi)acridin-9(10*H*)-ona (3f).



Figura 3.13. Compuesto AC6MOR (3f).

Ver **Figura 3.13.** Sólido aislado: 96% (0.38 g, 0.96 mmol), sólido color amarillo. Obtenido a partir del compuesto **2c** y morfolina.

Punto de fusión: 170-175 °C.

¹H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ 1.37-1.61 (m, 6H, CH₂), 1.77-1.86 (m, 2H, CH₂), 3.45-3.55 (m, 4H, CH₂-O), 3.64-3.72 (m, 6H, CH₂-N), 4.13 (t, J = 6.3 Hz, 2H, CH₂-O), 6.21 (d, J = 1.7 Hz, 1H, Ar-H), 6.39 (d, J = 2 Hz, 1H, Ar-H), 7.30 (t, J = 7.4 Hz, 1H, Ar-H), 7.52 (d, J = 8.4 Hz, 1H, Ar-H), 7.76 (t, J = 7.2 Hz, 1H, Ar-H), 8.19 (d, J = 8.0 Hz, 1H, Ar-H), 11.95 (s, 1H, NH), 14.23 (s, 1H, OH). Ver **Anexo, Figura 19**.

¹³C-RMN (75 MHz, DMSO-d₆): δ 26.3, 26.5, 27.5, 29.3, 54.1, 59.0, 66.9, 68.8, 90.5, 95.7, 104.8, 117.9, 119.9, 122.4, 126.0, 134.8, 141.7, 144.1, 164.4, 165.6, 181.2. Ver Anexo, Figura 20.

IR (KBr) v [cm⁻¹]: 3440 (N-H), 2943, 1648 (C=O), 1571, 1481, 817.

HRMS (EI) m/z: 396.2049 calculado para $C_{23}H_{28}N_2O_4$, encontrado 396.2053.

3.1.2 Derivado de Xantona

Se realizo la síntesis de un derivado de xantona, por similitud estructural con el compuesto **AC5DIE** (**3b**) descripto previamente. El procedimiento general se detalla en el **Esquema 3.14.**



Esquema 3.14. Síntesis del análogo de xantona **XA5DIE (6)**. Reactivos y condiciones: (i) ZnCl₂, POCl₃ (ii) Br(CH₂)₅Br, K₂CO₃, acetona seca, reflujo (iii) dietilamina, acetona seca, temperatura ambiente.

La 1,3-dihidroxi-9*H*-xanten-9-ona (1,3-DHX) se sintetizó mediante el protocolo de Grover, Shah y Shah ¹⁰⁷. Se añadió cloruro de fosforilo (0.8 ml) a la mezcla de ácido salicílico (138.1 mg, 1.00 mmol), floroglucinol (157.5 mg, 1.25 mmol) y cloruro de zinc anhidro (300 mg, 2.20 mmol) (**Esquema 3.15**). A continuación, la nueva mezcla se agitó a 65°C durante 4 a 8 horas. El progreso de la reacción se monitoreo mediante TLC. La mezcla de reacción se vertió luego sobre hielo triturado y se agitó durante 2 horas.



Esquema 3.15. Síntesis de 1,3-DHX (4). Condiciones de reacción: (i) ZnCl₂, POCl₃.

Posteriormente, se recogió el sólido y se lavó con una solución acuosa saturada de NaHCO₃ y agua antes de secarlo con Na₂SO₄ anhidro. La 1,3-DHX se utilizó en las reacciones posteriores sin purificación adicional.

Síntesis de 1,3-DHX (4).

Sólido aislado: 70% (0.16 g, 0.70 mmol), sólido color amarillo. Obtenido a partir de ácido salicílico y floroglucinol.

Punto de fusión: 255-257 °C.

¹H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ 6.20 (d, J = 2.1 Hz, 1H), 6.37 (d, J = 2.1 Hz, 1H), 7.42-7.45 (m, 2H), 7.55 (td, J = 8.0 Hz, 1H), 8.10 (dd, J = 8.0, 1H, 1.5 Hz), 11.07 (s, 1H), 12.80 (s, 1H). Ver **Anexo, Figura 21**.

¹³C-RMN (DMSO-*d*₆, 75 MHz): δ 95.1, 99.1, 103.1, 118.2, 120.7, 125.3, 126.6, 135.7, 156.4, 158.1, 163.8, 165.2,180.4. Ver **Anexo, Figura 22**.

IR (KBr), v [cm⁻¹]: 3327, 1654, 1610, 1570, 1491, 1470, 1445, 1222, 1163, 1078, 827, 762.

El segundo paso consistió en una reacción de sustitución nucleofílica bimolecular (**Esquema 3.16**) mediante una eterificación de Williamson selectiva del grupo hidroxilo fenólico en la posición de C3, la cual fue llevada a cabo por desplazamiento nucleofílico con 1,5-dibromopentano en presencia de K₂CO₃ y acetona seca como solvente, dando lugar al producto de *O*-alquilación **5**.



Esquema 3.16. Síntesis de 3-((5-bromopentil)oxi)-1-hidroxi-xanten-9(10*H*)-ona. Condiciones de reacción: (i) $Br(CH_2)_5Br$, K_2CO_3 , acetona seca, reflujo.

Para esta reacción se empleó la siguiente mezcla de reactivos:

- ✤ 1,3-DHX: 0.182 g (0.80 mmol).
- ✤ K₂CO₃: 0.221 g (1.60 mmol).
- Acetona seca: 4 ml, este volumen no es exacto ya que si la reacción lo requiere por evaporación del solvente se añade mayor cantidad.
- 1,5-dibromopentano: 0.16 ml (1.20 mmol). Se agrega en exceso, gota a gota con jeringa.
- Tiempo de reacción: 47 horas.
- Atmósfera de argón.

El monitoreo de la reacción se realizó con TLC. La mezcla de reacción se vertió en agua helada. El sólido amarillo resultante se recogió por filtración, se lavó con agua, se secó al aire y el residuo se purificó mediante recristalización con acetona y se filtró.

Síntesis de 3-(5-Bromopentiloxi)-1-hidroxi-9H-xanten-9-ona (5).

Sólido aislado: 50% (0.15 g, 0.40 mmol), sólido color amarillo. Obtenido a partir de 1,3-DHX (**4**) y 1,5-dibromopentano.

Punto de fusión: 126-128 °C.

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 1.31–1.40 (m, 2H), 1.85–2.00 (m, 4H), 3.46 (t, 2H), 4.01 (t, 2H), 6.33 (d, 1H), 6.41 (d, 1H), 7.34–7.40 (m, 2H), 7.70 (ddd, 1H), 8.24 (dd, 1H), 12.85 (s, 1H, OH). Ver **Anexo, Figura 23**.

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃): δ 24.8, 28.3, 32.5, 33.5, 68.3, 93.3, 97.5, 104.1, 117.7, 124.1, 126.1, 128.0, 135.1, 156.1, 157.8, 163.7, 166.3, 180.9. Ver Anexo, Figura 24.

IR (KBr), v [cm⁻¹]: 3460, 2946, 1661, 1609, 1573, 1481, 1296, 1163, 1038, 820.

Por último, se realizó la aminación del intermediario *O*-alquilado con dietilamina, resultando en el análogo **XA5DIE (6)**, como se observa en el **Esquema 3.17**.



Esquema 3.17. Síntesis del análogo de xantona **XA5DIE (6)**. Reactivos y condiciones: (i) dietilamina, acetona seca, temperatura ambiente.

Para esta reacción se empleó la siguiente mezcla de reactivos:

- ✤ 3-((5-bromopentil)oxi)-1-hidroxi-xanten-9(10H)-ona (5): 60 mg (0.16 mmol).
- Acetona seca: 0.16 ml.
- Dietilamina: 0.04 ml (0.40 mmol). Se agrega gota a gota con jeringa.
- Temperatura ambiente.
- Tiempo de reacción: 24-48 horas o hasta que se complete la reacción.

El monitoreo se realizó con TLC. La mezcla de reacción se vertió en agua helada, por filtración se obtuvo un sólido amarillo, el cual fue lavado con agua, luego se secó en vacío para dar el compuesto **(6)** sin mayor purificación.

Síntesis de 3-((5-(dietilamino)pentil)oxi)-1-hidroxi-9H-xanten-9-ona (6).

Sólido aislado: 80% (0.05 g, 0.13 mmol), sólido color amarillo. Obtenido a partir del compuesto **(5)** y dietilamina.

Punto de fusión: 70-71 °C.

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 1.05 (t, 6H), 1.51–1.70 (m, 4H), 1.82–1.93 (m, 2H), 2.48–2.52 (m, 6H), 4.05 (t, 2H), 6.34 (d, 1H), 6.41 (d, 1H), 7.45–7.51 (m, 2H), 7.71 (ddd, 1H), 8.23 (dd, 1H), 12.85 (s, 1H, OH). Ver **Anexo, Figura 25**.

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃): δ 12.0, 24.1, 26.8, 29.1, 47.1, 52.9, 68.7, 93.3, 97.6, 104.2, 117.8, 120.5, 124.1, 126.1, 135.0, 156.4, 157.8, 163.3, 166.5, 180.9. Ver **Anexo, Figura 26**.

IR (film), v [cm⁻¹]: 3440, 2964, 2790, 1660, 1603, 1571, 1472, 1329, 1298, 1179, 1079, 821, 758.

HRMS (EI) m/z: 369.1940 calculado para $C_{22}H_{27}NO_4$, encontrado 369.1944.

3.2 Materiales y métodos: Ensayos biológicos

3.2.1 Preparación de medio de cultivo

El Medio Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM) es un medio basal ampliamente utilizado para permitir el crecimiento de células en cultivo. Las células cultivadas con éxito en DMEM incluyen desde fibroblastos primarios, neuronas, células gliales, HUVEC y células de músculo liso, así como líneas celulares como HeLa, 293, Cos-7 y PC-12. En el desarrollo de esta Tesis se empleó el medio DMEM de Gibco, así como también el medio de Sigma Aldrich, ambos se muestran en la **Figura 3.18 (A) y (B)**.







Figura 3.18. Medio Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM). A) Medio Gibco. B) Medio D7777, Sigma Aldrich.

El medio DMEM de Gibco contiene:

- Alto contenido en glucosa (4500 mg/l)
- o L-glutamina
- o Rojo de fenol
- o Piruvato sódico

Libre de:

- o Ácido 4-(2-hidroxietil)piperazin-1-iletanosulfónico (HEPES)
- o Bicarbonato sódico

En general, cualquiera sea la procedencia del medio, se prepararon 2 litros empleando como material volumétrico un erlenmeyer previamente esterilizado por autoclave. El medio liofilizado se disolvió en agua bidestilada estéril; para asegurar una mezcla homogénea se colocó un imán en el erlenmeyer y se agitó la solución utilizando un agitador magnético. Antes de completar el volumen final a 2 litros, se agregó 3.00 g de bicarbonato de sodio (1.50 g de NaHCO₃/L de medio de cultivo), su agregado modificó el pH de la solución, lo cual se vio reflejado en el cambio de color del indicador de pH rojo de fenol. El pH recomendado para el medio de cultivo varía entre 7.2-7.4. Para lograr el pH requerido, se tituló con agregado de HCl o NaOH mientras se medía el pH. Luego de haber realizado un ajuste correcto del pH, se procedió a agregar 0.5% de antibióticos (penicilina 0.1 g y estreptomicina 0.25 g en 50 ml de agua bidestilada estéril) y 1% de antimicótico (0.1 g de nistatina en 50 ml de agua bidestilada estéril). Este agregado se realizó antes de completar el volumen para evitar variaciones en el volumen final del medio.

Esterilización del medio de cultivo. Se realiza mediante filtración con bomba de vacío bajo flujo laminar. Para esto, se utilizó una botella acoplada a un filtro (como el que se observa en la **Figura 3.19**).



Figura 3.19. Filtro empleado para esterilizar el medio de cultivo.

El medio de cultivo así preparado se conserva en heladera (4-10°C). Se realiza un control de esterilidad del medio colocando una fracción del mismo en una caja de Petri en el incubador durante unos días.

3.2.2 Uso de la campana de flujo laminar

La campana de flujo laminar es una estructura diseñada para establecer un flujo de aire vertical que actúa como una barrera evitando la dispersión de micropartículas y aerosoles generados durante la manipulación de cultivos. Este flujo de aire protege tanto al operador como al entorno, al crear una separación efectiva entre la zona de trabajo y el área ocupada por el trabajador.

El sistema de aspiración de la campana recolecta el aire contaminado, lo filtra y lo recircula parcialmente dentro de la campana, mientras expulsa el resto al exterior. Para asegurar una circulación de aire estabilizado, es recomendable poner en funcionamiento la campana de 15 a 20 minutos antes de iniciar cualquier actividad. Además, es esencial desinfectar la superficie de trabajo con una solución antiséptica, generalmente alcohol al 70%, antes de comenzar.

Es crucial disponer todo el material necesario dentro de la campana antes de iniciar el protocolo correspondiente, minimizando así la necesidad de entrar y salir del área de trabajo, evitando así cambios en la circulación del aire. La principal función de las campanas de flujo laminar es mantener un entorno libre de partículas, especialmente de contaminantes potenciales como bacterias y levaduras, que podrían comprometer los cultivos. Este objetivo se logra mediante un dispositivo mecánico que fuerza el aire a través de un filtro HEPA (*High Efficiency Particulate Air*). Existen dos tipos de campanas de flujo laminar, dependiendo de la ubicación del filtro HEPA y de la dirección del flujo de aire. En las campanas con flujo laminar vertical, el filtro HEPA está ubicado en el techo, mientras que en las de flujo laminar horizontal, el filtro se encuentra en la pared frontal. El filtro HEPA es capaz de retener partículas de tamaño inferior a 0.2 µM con una eficiencia del 99,999 %. El flujo de aire generado es laminar, lo que significa que es unidireccional y libre de turbulencias, evitando así la retención de partículas contaminantes en remolinos de aire ¹⁰⁸.

Se puede concluir que las campanas de flujo laminar son esenciales para proporcionar un ambiente controlado y libre de contaminantes durante la manipulación de cultivos, garantizando tanto la seguridad del operador como la integridad del experimento.

3.2.3 Descongelado de células

Las células son conservadas congeladas en criotubos (**Figura 3.20, A**) o crioviales en nitrógeno líquido (-196 °C). El proceso de descongelado de células consistió en sacar el criotubo del tanque de

nitrógeno siguiendo las normas de bioseguridad (guantes especiales con aislamiento de temperatura, antiparras, máscara de protección facial y guardapolvo), colocarlo en un baño de agua a 37 °C y luego transferir el contenido del criotubo a una botella (*flask*, **Figura 3.20 B**) con medio de cultivo DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB).



Figura 3.20. A) Criotubo o criovial. B) Flask.

3.2.4 Congelado de células

El proceso de congelado de células requiere ir disminuyendo la temperatura gradualmente. Para lograr esto, al repicar las células se inactivó la tripsina con SFB y al criotubo en el cual se pretende congelar se agregó un criopreservante, el dimetilsulfóxido (DMSO) que protege a las células. Este criotubo se guardó en freezer a -80 °C, usando un envase que permite un congelado gradual. A las 48 horas se colocó el mismo en el tanque de nitrógeno líquido a -196 °C.

3.2.5 Cultivo celular

Los cultivos celulares se mantuvieron en incubador metabólico (a 37 °C, bajo atmósfera humidificada de 95% aire/5.5% CO₂) hasta alcanzar un 70-80% de confluencia, momento en el cual se repican las células (ver definición más adelante). Para esto, se descartó el medio de cultivo (siempre trabajando en condiciones de esterilidad bajo campana de flujo laminar), las células no fueron afectadas por este procedimiento ya que se encontraban adheridas a la base del *flask* (placa de alto pegado de proteínas). Luego, se lavaron 3 veces con PBS 1X estéril para eliminar cualquier resto de medio de cultivo DMEM con SFB que pueda inactivar a la tripsina (se inactiva ante la presencia de SFB). Posteriormente, se agregó 100 µl de tripsina sobre el remanente de PBS 1X (ayuda a que la tripsina se esparza sobre la base del *flask*) y se colocó el *flask* en el incubador metabólico a 37 °C para activar la tripsina con calor, además se favoreció el desprendimiento de células dando unos suaves "golpes" en las paredes

laterales del *flask*. Se corrobora la acción de la tripsina al observar las células al microscopio, más pequeñas, redondeadas y en suspensión (se desprenden de la base del *flask*).

Se inactivó la tripsina con el agregado de medio DMEM con 10% de SFB. Luego con la ayuda de una pipeta se mezcló el medio con las células que se encontraban en suspensión, y se procedió a retirar del *flask* las células que eran requeridas para experimentos.

Tripsina: Para la preparación de 80 ml de tripsina, se necesita:

- Tripsina: 0.20 g.
- o EDTA: 0.0788 g.
- o NaCl: 0.34 g.

Los compuestos se disuelven en PBS 1X hasta completar el volumen. Como método de esterilización se empleó la filtración, para lo cual el volumen se pasa a través de filtros con la ayuda de una jeringa. Estos filtros tienen una membrana PES, con un tamaño de poro de 0.22 µM.

¿Qué significa el término *repique celular*? El repique de células consiste en transferir una determinada cantidad de células a un nuevo recipiente (*flask*, caja de Petri, *multiwell*, entre otros). Las células al encontrarse en continua división durante su cultivo crecen hasta ocupar toda el área disponible. Las células pueden cultivarse durante más tiempo al ser repicadas regularmente, ya que así se evita la senescencia asociada a situaciones prolongadas de alta densidad celular. Fueron descartadas luego de haber realizado 10 pasajes o repiques.

Usualmente los subcultivos o repiques se realizaron al llegar a un 70-80% de confluencia, evitando diversas situaciones:

- o El agotamiento de los nutrientes del medio de cultivo.
- o La acumulación de células apoptóticas o necróticas.
- La inhibición de la división celular por contacto.

Para realizar el subcultivo de células adheridas en monocapa, las células debieron ser inicialmente despegadas de la superficie a la cual se encontraban adheridas, esto se logró mediante procesos enzimáticos (tripsinización) o mecánicos (mediante raspado). Un pequeño número de las células despegadas puede sembrarse de nuevo. El cambio de medio de cultivo sirve para renovar los nutrientes y evitar la acumulación de productos metabólicos potencialmente tóxicos y de células muertas.

El término de repique se aplica para:

• Retirar células del *flask* y transferirlas a criotubos para congelar en nitrógeno líquido.

• Retirar células del *flask* para colocarlas en cajas de Petri/*multiwell* para realizar experimentos.

Siempre que tratemos las células con tripsina, para después pasarlas a otro recipiente o bien descartarlas, se considera repique.

Para realizar un experimento, luego del repique apartamos un pool de células para sembrar cajas de Petri, *multiwells* o la superficie que se necesite, para realizar esto debimos previamente calcular en función del número de células final que se necesite, el número de células a sembrar. Las células fueron contadas empleando una cámara de Neubauer.

La cámara de Neubauer es un portaobjetos especializado con un retículo grabado con un láser (**Figura 3.21**). Su construcción permite conocer el volumen de cualquier líquido colocado sobre él y por debajo de su cubreobjetos. El retículo se encuentra compuesto por nueve cuadrados de 1 mm² cada uno. Los cuatro cuadrados de 1 mm² localizados en cada esquina poseen a su vez 16 cuadrados de 0.0625 mm². El cuadrado central o retículo de Thoma (también de 1 mm²) se encuentra compuesto por 25 cuadrados de 0.04 mm². Estos cuadrados a su vez se encuentran compuestos por cuadrados menores de tan solo 0.0025 mm². Dada la profundidad de la cámara de tan solo 0.1 mm, cada una de estas unidades corresponde a volúmenes fijos conocidos.

A partir del número de células contados en los cuatro cuadrados secundarios de la cámara, y descartando el retículo de Thoma central, se calculó el promedio y se multiplicó por 10000, ejemplo: el conteo en los diferentes cuadrados arrojó los siguientes valores: 30/29/30/28. El promedio (29.25) se multiplicó por 10000 = 292500 células/ml.



Figura 3.21. Cámara de Neubauer y retículo de Thoma.

Si se requería sembrar 10000 células en una caja de Petri, el cálculo que se realizó fue el siguiente:

292500 células ----- 1000 µl

10000 células ----- x= 34.2 µl

Por lo tanto, a partir de la re-suspensión de células, se sacó 34.2 µl de medio con células y luego se agregó en la caja de Petri el volumen de medio DMEM con SFB necesario para que las células proliferaran.

3.2.6 Ensayos Western blot

Es una técnica utilizada para identificar una proteína en una muestra que contiene una mezcla de proteínas. Las proteínas se separan mediante electroforesis en un gel en función de su peso molecular, luego se utiliza un anticuerpo específico para detectar la proteína de interés y el resultado obtenido aporta información sobre su cantidad relativa en la muestra.

Durante el desarrollo de esta Tesis interdisciplinaria se recurrió en vastas ocasiones a esta técnica, ya que es una herramienta que permitió determinar si el tratamiento con distintos agentes químicos provocó cambios en el nivel de expresión de la proteína de interés o bien en sus niveles de activación.

Preparación de las muestras

Se sembraron células en cajas de Petri de 6 cm de diámetro, se agregaron 3 ml de medio DMEM suplementado con 10% de SFB. Se dejaron crecer en incubador metabólico (a 37 °C, bajo atmósfera humidificada de 95% aire/5.5% CO₂) hasta alcanzar un 70-80% de confluencia. Luego se realizó la deprivación de suero con 3 ml del mismo medio, pero con 1% de SFB, con el fin de sincronizar a todas las células en la misma fase del ciclo celular para que reciban todas de igual manera el tratamiento que se realiza posteriormente con los compuestos de interés, a las dosis y tiempos que se considere. Una vez finalizados los tratamientos, las cajas de Petri con las células fueron mantenidas en freezer (-20 °C) hasta el momento de su procesamiento. Se les agregó buffer lisis 1X (BL 1X) con una mezcla de inhibidores de proteasas para preservar la estructura de las proteínas que son objeto de interés durante todo el procedimiento; si la proteína de interés está fosforilada, es importante incluir además inhibidores de fosfatasas. El BL 1X con la mezcla de inhibidores debe ser preparado en el momento y mantenerse en hielo.

Composición del Buffer Lisis 1X (1 ml):

- o 500 μl BL 2X (20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1% nonidet p40)
- o 4 µl aprotinina
- 4 µl leupeptina

- ο 5 μl PMSF
- \circ 5 µl Na₃VO₄
- ο 50 μl NaFl
- o 10 µl nonidet*
- o 422 µl agua bidestilada

*Los detergentes como tritón X100 y SDS provocan interferencias y se encuentran muchas veces presentes en los buffers que se utilizan para lisar las células, es conveniente hacer un blanco de reactivo con buffer agregando el mismo volumen que proteínas a cuantificar.

Las células con BL fueron sometidas a lisis mecánica con la ayuda de un *scrapper*. El lisado obtenido, se agitó en *vórtex* y se congeló, ya que el proceso de congelamiento y descongelamiento contribuye con la lisis celular. Una vez descongelado, el lisado se centrifugó a 4 °C, 14000 rpm durante 14 minutos, se obtuvo así un pellet con restos celulares (que es descartado) y un sobrenadante, el cual fue aspirado y mantenido en hielo.

Con el sobrenadante así obtenido se realizó la cuantificación de proteínas por el micrométodo de Bradford.

Cuantificación de proteínas por el método de Bradford.

Preparación del reactivo de Bradford:

- 1) Se pesó 100 mg de colorante coomassie brillant blue G-250.
- 2) Se disolvió el colorante en 50 ml de etanol en vaso de precipitado con agitador magnético.
- 3) En probeta de vidrio se midió 100 ml de ácido fosfórico 85% y se agregó a la solución anterior.
- 4) Se llevó a 1 litro con agua bidestilada.
- 5) Se filtró (se puede reutilizar el filtro empleado para esterilizar el medio de cultivo, con papel de filtro).
- 6) Una vez filtrado, el reactivo está listo para ser usado.

Curva de Calibrado

Se utilizó albúmina (BSA) como estándar en concentraciones crecientes, se preparó un stock con 1 mg/1 ml H_2O destilada.

Se utilizó de 5 a 50 µl de BSA (micrométodo), como se puede ver en la Tabla 3.22.

TUBO	BSA (μl)	H₂O (μl)	Reactivo (ml)	µg de proteína
Blanco	0	50	2.5	0
1	5	45	2.5	5
2	10	40	2.5	10
3	20	30	2.5	20
4	30	20	2.5	30
5	40	10	2.5	40
6	50	0	2.5	50

Tabla 3.22. Curva de calibrado. Micrométodo de Bradford.

Se mezcló en vórtex y se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente. El color es estable entre 2-60 minutos, para mediciones más precisas se debió leer entre los 5-20 minutos luego del agregado del reactivo. Se determinó la absorbancia a 595 nm.

En la práctica las mediciones se realizaron por duplicado o triplicado para disminuir el error operacional.

Luego de realizar la cuantificación de proteínas, todas las muestras se llevaron al mismo volumen con BL 1X y se *crackearon* mediante el agregado de buffer muestra (BM 6X: Tris - HCl 125 mM - pH = 6.8; SDS 4%; β -mercaptoetanol 10%; glicerol 20%; azul de bromofenol 20 µg/ml) en cantidad necesaria para obtener una concentración final de BM 1X. Este buffer contiene SDS (dodecilsulfato sódico) y β mercaptoetanol o DTT (ditiotreitol). El SDS desnaturaliza las proteínas en su estructura primaria y las recubre con cargas negativas. El β -mercaptoetanol y el DTT son agentes reductores que rompen los puentes disulfuro (**Figura 3.23**). Esto permitirá que las proteínas se separen en función del peso molecular mediante SDS-PAGE (PAGE: Electroforesis en geles de poliacrilamida). Además, la reducción y desnaturalización permitirán la posterior accesibilidad del anticuerpo a su sitio de unión.



Figura 3.23. Efecto del SDS y DTT/ β -mercaptoetanol sobre una proteína.

Hay que tener en cuenta que algunos anticuerpos sólo reconocen las proteínas nativas (no reducidas y/o no desnaturalizadas), en ese caso no debe añadirse SDS y/o β -mercaptoetanol o DTT en la preparación del BM.

Por último, las muestras se colocaron a 100 °C durante 5 minutos para completar el proceso de desnaturalización de las proteínas. Las muestras así procesadas se conservaron en el freezer.

SDS-PAGE

Método que permite separar las proteínas bajo un campo eléctrico de acuerdo con su movilidad electroforética. Se emplean geles de SDS-poliacrilamida discontinuos (gel de stacking: 4%; gel de separación: 10-12%), la corrida se efectúa a 60 mA por gel ¹⁰⁹. La estructura del gel puede modificarse alterando la proporción de acrilamida: para proteínas pequeñas, se usa un gel con un porcentaje elevado de acrilamida, mientras que para proteínas de gran tamaño se usa un gel con un bajo porcentaje de acrilamida, como se observa en la **Tabla 3.24**. Los geles en gradiente se recomiendan en aquellos casos en los que se desconoce el tamaño de la proteína.

Tamaño de la proteína (kDa)	Porcentaje del gel (%)
4-40	20
12-45	15
10-70	12.5
15-100	10
25-200	8

Tabla 3.24. Relación entre el tamaño de la proteína y el porcentaje de acrilamida-bisacrilamida del gel.

Dicho de otra forma, a mayor concentración del gel (% de acrilamida-bisacrilamida), el entrecruzamiento es mayor, el tamaño de poro es menor, permite resolver proteínas de menor peso molecular. Por el contrario, a menor concentración del gel, el entrecruzamiento es menor, el tamaño de poro es mayor, permite resolver proteínas de mayor peso molecular.

Las proteínas de menor tamaño se resuelven en la parte inferior del gel y las de mayor tamaño van quedando retrasadas al atravesar la malla del gel, observándose en la parte superior.

Podemos concluir que, dependiendo del tamaño o peso molecular de las proteínas que se quiera revelar con el Western Blot, se elige el porcentaje del gel a preparar. En general, el tamaño de las proteínas de interés para esta Tesis se encontró en el rango 15-100 kDa, por lo que, en la mayoría de los casos se empleó un 10% de acrilamida-bisacrilamida en los geles.

En la preparación de geles, se necesitó preparar a su vez:

- *Gel UP* (arriba) o *Gel Stacking*, permite que las proteínas presentes en cada calle ingresen al gel al iniciar la corrida. Se trata del gel más laxo.
- Gel DOWN (abajo) o Gel Running, permite la separación de las proteínas. Son los geles resolutivos.

Los geles son preparados en el soporte provisto por el kit para tal fin (**Figura 3.25**), por lo general siempre se prepararon 2 geles, como se indica en la **Tabla 3.26**.



Figura 3.25. Preparación de geles en el soporte provisto por el kit.

	Gel Running (ml)	Gel Stacking (ml)
Agua bidestilada	7.9	4.1
Acrilamida/Bisacrilamida (monómero)	6.7	1.0
Tris 1.5 M (pH 8.8)	5.0	0.0
Tris 1.0 M (pH 6.8)	0.0	0.75
SDS 10%	0.2	0.06
APS 10%*	0.2	0.06
TEMED*	0.008	0.006

Tabla 3.26. Soluciones para la preparación de geles resolutivos 10% (10 ml/gel) y geles de Stacking 5% (3 ml/gel). Esto fue modificado de Harlow and Lane (1988).

*APS y TEMED se agregan en última instancia, inmediatamente antes de colocar la solución en el soporte para geles, ya que rápidamente producen la gelificación o solidificación del gel.

Primero se preparó el *gel running* y una vez que gelificó, se agregó el *gel stacking* encima, y por último el peine para que gelifique con las calles.

En la cámara de electroforesis se agregó lentamente buffer cámara reciclado 1X hasta la marca de dos geles según sea el caso (no tiene contacto con las muestras) evitando la formación de burbujas que dificultarían el paso de la corriente. Luego, se colocó los vidrios que contienen los geles y entre los mismos buffer cámara nuevo 1X (interactúa con las proteínas, razón por la cual es utilizado una única vez y luego descartado). El buffer cámara 1X se preparó a partir de la dilución del 4X (Tris BASE 12 g; Glicina 57.6 g; SDS 4 g y se completa a 1 litro con agua destilada).

Los lisados se cargaron en las calles del gel, normalmente entre 20 y 40 µg de proteína por calle (generalmente se utilizó 30 µg de proteína en promedio). Los lisados poseen color azul por el buffer muestra, lo que permite visualizar cuando la muestra ingresa en la calle. Se aplicó un campo eléctrico que provocó el movimiento de las proteínas hacia el polo positivo, ya que al haberse tratado previamente con SDS, las proteínas presentaron carga negativa. El resultado es que las proteínas son separadas en función de su peso molecular, quedando las de menor tamaño menos retenidas en la matriz del gel y por tanto migran más rápidamente (**Figura 3.27, A y B**).

A)



B)



Figura 3.27. A) Corrida electroforética. B) Sentido de la corriente electroforética.

Además de las muestras, se debió sembrar un marcador de peso molecular en cada gel (**Figura 3.28**), generalmente en la primera calle, el cual se diluye con BM 1X. Como marcador de peso molecular se empleó estándares de proteína teñidos de color azul, con tres bandas de referencia de alta intensidad (25, 50 y 75 kD), y que proporcionan una alta consistencia en el peso molecular entre diferentes lotes.



Figura 3.28. Estándares de proteína teñidos de color azul, Marker de BIO-RAD.

En las calles sin sembrar, se agregó únicamente BM 1X, ya que de lo contrario dichas calles presentan la tendencia a distorsionarse. Una vez que todas las muestras fueron sembradas, se conectó la cámara a una fuente de poder (rojo \rightarrow ánodo (+), negro \rightarrow cátodo (-)), y se corrió a 100 V durante 90 minutos. Una vez finalizada la corrida, se retiraron los geles de la cámara.

Transferencia gel-membrana

Una vez realizada la electroforesis, es necesario marcar la proteína de interés para poder visualizarla. El gel no es una superficie adecuada para poder marcar las proteínas, ya que los anticuerpos no son retenidos en el mismo y además los geles son frágiles y difíciles de manipular. Por lo tanto, es necesario transferir las proteínas a un soporte más adecuado.

El principio es similar al de PAGE, es decir, las proteínas cargadas negativamente migran hacia el polo positivo bajo el efecto de un campo eléctrico. Se intercala una membrana entre el gel y el electrodo positivo. Las membranas pueden ser de nitrocelulosa o polifluoruro de vinilideno (PVDF), estas últimas requieren un pretratamiento de activación con metanol. Las proteínas se adhieren a la membrana siguiendo la misma disposición que en el gel.

La transferencia puede ser en medio húmedo o semi seco:

- Medio húmedo: El gel y la membrana se intercalan y fijan entre finas esponjas y papel absorbente. Este montaje tipo "sándwich" se sumerge en un compartimento que contiene el tampón de transferencia donde se aplica a continuación la corriente eléctrica. Un tampón de transferencia se compone normalmente de 25 mM Tris, 190 mM glicina y 20% de metanol. Este medio es adecuado para proteínas grandes o difíciles de transferir, aunque el proceso de transferencia requiere mayor tiempo.
- Medio semi seco: El montaje papel-gel-membrana-papel se humedece con tampón de transferencia. El montaje se coloca directamente entre el cátodo y el ánodo donde se aplica la

corriente. El tampón de transferencia estándar suele contener 48 mM Tris, 39 mM glicina, 0.04% SDS, y 20% metanol. Presenta la ventaja de que la transferencia será más rápida, pero la membrana puede secarse durante el proceso afectando la transferencia de las proteínas.

En el caso de esta Tesis Doctoral, se realizó la transferencia en medio semi seco. Se armó un *"sándwich"* de la siguiente manera (**Figura 3.29**):

- o 3 papeles.
- Membrana de PVDF de 0.45 μM, se manipuló con pinza, con el debido cuidado evitando tocarla con las manos. Debió ser previamente activada durante 40-45 segundos con metanol, ya que al estar seca sus poros se encuentran cerrados, no se debe exponer demasiado al metanol ya que comienza a degradar la membrana.
- o El gel.
- 3 papeles (hay quienes usan 2 papeles en lugar de 3).
- TODO debió estar completamente embebido en buffer de transferencia (papeles, membrana y gel), ya que al estar todo húmedo se evita que se genere resistencia.



Figura 3.29. "Sándwich" para la transferencia.

Se conectó el equipo para la transferencia a la fuente de poder, en el caso en que se transfirieron dos geles, se realizó la corrida a 250 mA mientras que, si sólo transfirió un gel, la corrida se realizó a 125 mA. La transferencia tuvo lugar durante 1 hora y 30 minutos.

En la transferencia principalmente se transfieren las proteínas de menor peso molecular, las más pequeñas, en caso de necesitar que se transfieran las proteínas más grandes se necesitaría un mayor tiempo de transferencia.

Una vez finalizada la transferencia, se coloreó el gel para confirmar que se realizó correctamente la transferencia y que las proteínas corrieron como debían. Para evitar que los geles se sequen, se conservaron en agua.

La membrana se bloqueó con leche-TBST, preparado a partir de 2.5 g de leche que se llevaron a volumen de 50 ml con TBST. Este bloqueo se realizó con agitación durante 1 hora. Se usó leche descremada ya que contiene muchas proteínas, lo que permite que se bloqueen los sitios de unión inespecíficos, de modo que cuando la membrana es incubada con el anticuerpo de interés, su unión es específica, no se une a los sitios en los que no se encuentra la proteína de interés. Como medio de bloqueo también se puede emplear BSA (seroalbúmina bovina), pero es más económico el empleo de leche–TBST.

Para preparar TBST 0.1%, primero se preparó TBS 5X:

TBS 5X: pesar 30.28 g de TRIS-HCl (básico) y 58.44 g de NaCl, disolver en 500 ml de agua bidestilada con agitación, la solución tendrá un pH aproximado de 10.5, se debe llevar a pH 7.4, para lo cual se empleó HCl concentrado. Una vez que se encuentra en el pH requerido, se lleva a volumen final de 1 litro con agua bidestilada.

A partir del TBS 5X, se prepara TBST 0.1%, para lo cual primero se debió diluir a TBS 1X con agua bidestilada y luego agregar detergente *Tween* al 0.1%.

Inmunodetección

Las proteínas se pueden teñir con colorantes como *Coomassie* después de realizar el SDS-PAGE, pero en ese caso no tendríamos manera de identificar cuál de las bandas corresponde a la proteína de interés. El uso de anticuerpos específicos soluciona el problema detectando únicamente la proteína de interés.

Los pasos que siguieron al bloqueo fueron los siguientes:

- 1. Se incubó la membrana con el anticuerpo primario preparado en BSA. Se incubó *overnight* (durante toda la noche) a 2-8 °C (heladera).
- Se lavó la membrana con TBST 0.1%, para eliminar los restos de anticuerpo primario no unido que pudieran haber quedado. Para esto se realizaron tres lavados (el primero de 10 minutos y los últimos dos, de 5 minutos cada uno, con agitación).
- 3. Se incubó con el anticuerpo secundario conjugado con una enzima, preparado en buffer de bloqueo para evitar uniones inespecíficas (leche-TBST). Se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente en agitación. Se podría emplear un único anticuerpo específico para la proteína de interés que esté además conjugado con una enzima, pero esto incrementaría los costos.
- 4. Se lavó con TBST 0.1%, para eliminar los restos de anticuerpo secundario no unido que pudieran haber quedado. Al igual que en el paso 2, se realizaron tres lavados (el primero de 10 minutos y los últimos dos, de 5 minutos cada uno, con agitación).

5. Detección.

Un sustrato quimioluminiscente, como el ECL (*Enhanced chemiluminescence*), reacciona con el anticuerpo secundario conjugado a la enzima HRP (*HorseRadish Peroxidase*), produciendo una señal que se captura en una película fotográfica.

También pueden emplearse sustratos cromogénicos, como el 4-cloronaftol o DAB, que pueden usarse con la enzima HRP o AP, dando lugar a un producto coloreado que se deposita en la membrana próximo a la zona del anticuerpo.

Los anticuerpos secundarios conjugados a fluoróforos también pueden usarse si se dispone del equipo de detección especial.

Se preparó la mezcla de sustratos en el momento en que fue requerido, ya que tiene un período de actividad de 30 minutos.

Se incubó la membrana con el sustrato en oscuridad, durante 5 minutos. Luego, se expuso a placas radiográficas durante un determinado tiempo y luego fueron reveladas empleando un líquido de revelado y posteriormente un fijador que además permite aclarar el color de fondo de la placa. La exposición a las placas radiográficas y posterior revelado debe realizarse en oscuridad. Un adecuado revelado de las placas se logra luego de mucha práctica. Posteriormente estas placas fueron escaneadas y con la ayuda del programa *ImageJ*, se cuantificaron las bandas.

Controles de carga

Los controles de carga son anticuerpos usados para asegurar que la carga de proteínas en cada calle del gel de SDS-PAGE es constante de modo que, en caso de observar diferencias en la cantidad de proteínas de cada calle, sea como consecuencia de los tratamientos realizados y no por una desigual carga de proteínas en cada calle. Se pueden emplear para tal fin, anticuerpos que detecten la proteína total (por ejemplo, Akt total), o bien un anticuerpo que reconozca una proteína que no es afectada por el tratamiento que se realizó previamente. Además, hay que tener en cuenta que la banda generada por el control de carga no interfiera con la banda que genera la proteína que se está investigando.

Un anticuerpo control de carga detecta una proteína altamente conservada y presente en cantidades similares independientemente del tipo de muestra. En esta Tesis, se empleó mayoritariamente como controles de carga: GAPDH (PM: 36 KDa.) y β-tubulina (PM: 55 KDa.)

Además, se pueden agregar controles positivos y negativos, es decir realizar en paralelo el ensayo de muestras desconocidas con muestras en las que se ha comprobado la cantidad de proteína de interés

presente; como veremos en esta Tesis el caso del empleo del conocido inhibidor de PI3K/Akt: LY294002.

Algunas consideraciones importantes:

- El buffer de transferencia no debe ser descartado en pileta, ya que tiene metanol, por lo que debe descartarse en un recipiente adecuado para tal fin.
- Geles de Poliacrilamida: la mezcla de acrilamida con bisacrilamida no es tóxica salvo que entre en contacto con una herida. Se comercializan en polvo y son neurotóxicas. Se debe usar las medidas de protección adecuadas para preparar dicha mezcla.
- El anticuerpo primario es específico de la proteína que se quiere detectar, pero su especificidad es limitada, de lo contrario no deberíamos usar leche para el bloqueo. La leche bloquea los sitios de unión inespecíficos, incluso se puede unir a la proteína de interés, pero dada la especificidad del anticuerpo primario, igualmente va a poder ser detectada. El agregado del anticuerpo secundario es el que determina la sensibilidad.
- Generalmente las membranas son reutilizadas, en estos casos se lavan repetidas veces con TBST 0.1%, aunque esto no asegura que se separen los anticuerpos. Se debe tener en cuenta incubarla con un anticuerpo que reconozca otra proteína de peso molecular lo suficientemente diferente a la ya detectada, de modo que al revelar se obtenga una banda separada de los anticuerpos revelados previamente. En caso de necesitar asegurarse de que los anticuerpos sean eliminados de la membrana, ya que se necesita revelar una proteína con un peso molecular similar a la ya revelada, se puede recurrir al *stripping* como se explica a continuación.

Stripping

Este procedimiento se emplea para eliminar los anticuerpos con los que se incubó previamente a las membranas, ya sea para volver a incubarlas con los mismos anticuerpos en caso de que no se haya obtenido resultados o bien en caso de que se quiera incubar con anticuerpos que reconocen proteínas con un peso molecular similar a las reveladas previamente.

Para realizar este procedimiento se incubó las membranas con buffer *stripping* previamente atemperado (62.5 mM Tris-HCl, pH 6.8, 2% (p/v) SDS, 50 mM β-mercaptoetanol, agua bidestilada) durante 30 minutos en agitación con un estricto control de la temperatura (55 °C) y el tiempo de incubación. Luego se lavó las membranas con TBST, y se realizó nuevamente el bloqueo con TBST-leche, para agregar luego el anticuerpo contra la proteína de interés.

3.2.7 Ensayo de Viabilidad celular con Trypan Blue

El *Trypan blue* (azul de tripán) es un colorante que fue usado para eliminar las infecciones por tripanosomas en ratones ¹¹⁰. Su nombre se deriva de su capacidad para eliminar el *trypanosoma*, parásito responsable de producir la enfermedad de Chagas en América, enfermedad del sueño en África y Leishmaniasis. Este es un colorante derivado de la toluidina que posee la capacidad de teñir tejidos y células muertas; es uno de los colorantes empleados para evaluar la viabilidad celular por exclusión del mismo, ya que no puede penetrar y teñir a las células vivas con membranas íntegras. El azul de tripán no es necesario para realizar un conteo simple de células, pero sí es imprescindible para diferenciar entre células muertas que presentan una disrupción en su membrana, y células vivas con membrana íntegra. En este procedimiento, una suspensión de células es mezclada con una solución de azul de tripán antes de ser observada bajo el microscopio haciendo uso de una cámara de Neubauer. A pesar de que el protocolo original estipulaba el uso de una mezcla isovolumétrica de azul de tripán y suspensión celular (por ejemplo, 10 µl de suspensión celular y 10 µl de azul de tripán), también se puede hacer uso de otros tipos de diluciones (especialmente para suspensiones celulares muy concentradas), siempre y cuando se considere el factor de dilución correspondiente en los cálculos finales.

A partir del cultivo celular, se realizó la siembra celular empleando un *multiwell* de 24 pocillos, sembrando en cada uno de ellos, 10000 células en un volumen final de 1 ml de medio DMEM suplementado con 10% SFB. Se dejaron crecer en incubador metabólico (a 37 °C, bajo atmósfera humidificada de 95% aire/5.5% CO₂) hasta alcanzar un 70-80% de confluencia. Una vez finalizados los tratamientos, se frenaron mediante el aspirado y descarte del medio de cultivo. Luego, se realizaron 2-3 lavados con PBS 1X no estéril atemperado a 37 °C.

PBS 10X: para preparar 1 litro, se pesó 80 g de NaCl, 2 g de KCl, 14.4 g de Na₂HPO₄ anhidro, 2.4 g de KH_2PO_4 y se agregó 800 ml aproximadamente de H_2O bidestilada. Se llevó a pH 7.4 y se completó el volumen a 1 litro con H_2O bidestilada, se esterilizó en autoclave. Para preparar PBS 1X, se diluyó el PBS 10X con agua bidestilada.

Una vez que se realizaron los lavados, se agregó tripsina no estéril a cada pocillo o *well*, la cual es activada a 37 °C en incubador y una vez que se corroboró mediante visualización al microscopio que todas las células se despegaron de la superficie y adquirieron una forma redondeada, se procedió a inactivar la tripsina con medio DMEM con 10% de SFB no estéril, ya que se trabaja fuera de la campana de flujo laminar, en condiciones de no esterilidad.

Se recogió el volumen de cada *well* en *eppendorf* rotulados, y se tomaron 90 µl de la suspensión celular, se agregaron 10 µl de *Trypan blue* (concentración final de 10%). Se mezcló la suspensión celular con el colorante por pipeteo 5 a 8 veces. Una alícuota de esta solución se colocó en cámara de Neubauer y se localizó el retículo grabado. Se permitió que las células se asienten durante 1-2 minutos y se procedió a realizar el recuento. Se contó el número de células vivas que repelen el colorante y que se visualizaban gracias a su refringencia, y también se contaron las células muertas en las que su membrana permitió la entrada del colorante, razón por la cual se observaron teñidas de violeta al microscopio óptico (**Figura 3.30, A y B**). En cada cuadrante externo se debe contar entre 20-50 células, teniendo un total de células para los cuatro cuadrantes de 50-200 células, las células localizadas en los márgenes externos de cada esquina no deben ser incluidas en el recuento.



Figura 3.30. A) Conteo celular en un cuadrado secundario de la cámara de Neubauer. B) Célula muerta teñida con azul de tripán.

Colorante Trypan Blue 0.4 %: Se pesó 0.4 g de azul de tripán y se le agregó 100 ml de PBS 1X no estéril. Posteriormente, esta suspensión fue filtrada a través de un papel de filtro con la ayuda de un embudo.

Hay que tener en cuenta que las células mezcladas con azul de tripán deben ser evaluadas inmediatamente, ya que una exposición de las células al colorante superior a los 10 minutos provoca que incluso las células vivas capten el colorante.

Las células que murieron durante el tratamiento se despegaron de la superficie del *multiwell* y se encontraron flotando en el medio de cultivo, no fueron consideradas en los experimentos, ya que

cuando fueron contadas, se determinó que no representaban una cantidad significativa a tener en cuenta.

3.2.8 Citometría de Flujo por incorporación de loduro de Propidio

La citometría de flujo es un método analítico que permite la medición rápida de ciertas características físicas y químicas de células o partículas suspendidas en un líquido, que producen una señal de forma individual al interferir con una fuente de luz. Una de las características analíticas más importantes de los citómetros de flujo es su capacidad de medir múltiples parámetros celulares, como el tamaño, forma, complejidad, y cualquier componente celular o función que pueda ser marcada con un fluorocromo.

Se sembraron 3000 células para los tratamientos a 24 horas y 1500 células para los tratamientos a 48 horas, en cajas de Petri de 6 cm de diámetro y se agregaron 3 ml de medio DMEM suplementado con 10% de SFB. Se dejaron crecer en incubador metabólico (a 37 °C, bajo atmósfera humidificada de 95% aire/5.5% CO₂) hasta alcanzar un 70-80% de confluencia. Luego se realizó la deprivación de suero con 3 ml del mismo medio, pero con 1% de SFB, con el fin de sincronizar a todas las células en la misma fase del ciclo celular para que reciban todas de igual manera el tratamiento que se realiza posteriormente con los compuestos de interés, a las dosis y tiempos que se considere. Una vez finalizados los tratamientos se procedió al frenado de las células para citometría de flujo, de la siguiente manera:

- Se prepararon tubos con 2 ml de medio DMEM con 10% de SFB (tantos tubos como condiciones se tenga). Se necesitaron tubos Falcon para favorecer la formación del pellet de células.
- 2. Se aspiró el medio de cultivo de las cajas de Petri con bomba.
- 3. Se lavó las cajas con PBS 1X atemperado a 37 °C (2 veces).
- Se aspiró el PBS, y luego se agregó 500 μl de PBS (no debe ser exacto) y 100 μl de tripsina, dejando que actúe la tripsina.
- 5. Se agregó medio DMEM con 10% de SFB para inactivar la tripsina (puede provenir de los 2 ml totales que hay en los tubos Falcon). Luego a modo de arrastre con la pipeta se juntó la suspensión celular y se colocó en los tubos Falcon con los 2 ml de DMEM con 10% de SFB, se resuspendió con pipeta para evitar que queden conglomerados de células.
- 6. Se centrifugó a 2200-2500 rpm durante 10 minutos.

- Se descartó el sobrenadante por volcado eliminando hasta la última gota con un papel absorbente y se agregó 1.5 ml de PBS 1X frío, se resuspendió y se mantuvo todos los tubos en hielo.
- 8. Se encendió el *vórtex* a velocidad mínima y continua. Inmediatamente se agregó 3.5 ml de etanol absoluto frío (de freezer) lentamente por las paredes del tubo, agitando muy despacio.
- 9. Se colocaron en hielo y posteriormente se conservaron en el freezer.
 El día que se procesaron las muestras en el citómetro se debieron realizar previamente los siguientes pasos:
- 10. Se dejó atemperar los tubos a temperatura ambiente (no se recomienda realizar este proceso con el baño de agua).
- 11. Se centrifugó a 1200 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente, descartando el sobrenadante por volcado, en este paso se debió obtener un pellet blanco de células.
- 12. Se lavó dos veces el pellet con PBS 1X con 0.1% de Tween (50 ml PBS 1X + 50 µl de Tween). Para realizar esto, al pellet se le agrego 1 ml de PBS 1X con Tween, se resuspendieron las células con pipeta y se pasó el contenido a un *eppendorf* de 1.5 ml y se centrifugó a 1200 rpm durante 10 minutos. Se eliminó el sobrenadante por volcado y se agregó 1 ml de PBS 1X con 0.1% de Tween, se resuspendió nuevamente con pipeta, y se volvió a centrifugar. Nota: se pasó el contenido del tubo Falcon al *eppendorf*, porque el último paso consiste en agregar el kit (ioduro de propidio) el cual es cancerígeno y hay que descartar todo el material que tome contacto con el mismo, por lo que es más factible descartar tantos *eppendorf* como muestras se tenga, antes que descartar muchos tubos Falcon.
- 13. Se eliminó el sobrenadante por volcado.
- 14. Se agregó el kit (entre 300-500 µl dependiendo de la cantidad de células) en oscuridad, y se resuspendió las células con pipeta.
- 15. Por último, se agregó el contenido de cada *eppendorf* a los tubos que son aptos para el citómetro, protegiéndolos de la luz.
- 16. Se llevó las muestras al citómetro.

Hay que tener en cuenta:

- ο Volumen mínimo de muestra 500 μl.
- Cantidad recomendada de células 10⁵-10⁷ por ml.
- Se pierden muchas células en los sucesivos lavados y marcación, por lo que es un punto a considerar a la hora de elegir cuántas células sembrar al inicio del experimento.

Usando los reactivos adecuados, el citómetro nos arroja los histogramas y además un gráfico del ciclo celular modelado, empleando el modelo de Watson, se busca el pico más alto (G1) y se determina la fase G2 y S.

3.2.9 Ensayo de la herida

El ensayo de cierre de la "herida", conocido también como "*wound healing assay*" en inglés, tiene como objetivo el estudio de la migración celular, un proceso fundamental en la biología del desarrollo, la cicatrización de heridas, y la progresión del cáncer. Es un ensayo fácil, barato y ampliamente utilizado en investigación ¹¹¹.

Se basa en la observación del comportamiento de una monocapa confluente de células a la que previamente se le ha realizado una brecha o "herida". Las células en el borde de la herida se moverán hacia la abertura hasta establecer nuevos contactos célula-célula, cerrando así la herida ¹¹².

Los pasos básicos consisten en la creación de la "herida" o área libre de células en la monocapa celular, la captura de imágenes de manera periódica durante el experimento y la comparación de todas las imágenes para determinar la velocidad de migración de las células.

Este experimento permite analizar tanto la migración de la monocapa, así como el movimiento de células individuales.

Este ensayo presenta algunas desventajas, como se numera a continuación:

- El tamaño, forma y ancho de las heridas puede variar entre pocillos del mismo ensayo, ya que generalmente se realizan las heridas de manera manual.
- En algunas ocasiones es difícil asegurar que tanto las condiciones control como los tratamientos, se realicen en condiciones equivalentes de confluencia celular.
- El proceso para crear la herida se realiza con un *tip*¹¹³, esto puede rayar la monocapa, lo que daña la capa de matriz extracelular subyacente, creándose un surco que impide la correcta migración de las células hacia el centro de la herida.
- Los resultados se pueden ver comprometidos por la liberación de factores desde las células dañadas por el raspado al hacer la herida ¹¹⁴, de ahí la importancia de realizar varios lavados luego de realizar la herida.

Generalmente se toman las fotografías en microscopía de campo claro o también se puede usar técnicas de fluorescencia.

Las células se cultivan hasta una confluencia del 90% aproximadamente. El número de células necesario para crear una monocapa confluente depende del tipo celular empleado y se debe adaptar a cada línea celular. Independientemente de los tratamientos, los cultivos deben estar confluentes al comienzo del experimento.

Pueden emplearse *multiwells* de 6 pocillos para tener un campo más claro a la hora de elegir la zona de la herida o poder tomar imágenes de varios campos de cada pocillo. También es posible utilizar *multiwells* de 24 pocillos, aumentando el número de réplicas de cada condición en un mismo experimento. Cuanto más grande sea el pocillo de la placa (*multiwell* de 6> *multiwell* de 24), la manipulación será más fácil a la hora de realizar la herida, esta será más larga y se podrán realizar varias heridas en un mismo pocillo evitando así las zonas en las que la herida se ve defectuosa.

Se recomienda hacer entre 1 y 3 heridas por pocillo, según el tipo de placa elegida. La trayectoria puede ser horizontal o vertical. Para ello se utilizarán *tips* estériles amarillos (200 µl). Se arrastrarán por la monocapa realizando una herida lo más recta posible.

Es muy importante, como se aclaró previamente, lavar 2 veces la placa con PBS 1X estéril, para descartar los restos celulares desprendidos de la zona de la herida. Luego, se agrega medio de cultivo con o sin tratamiento, según corresponda.

La cantidad de imágenes obtenidas durante el experimento depende del objetivo y del conocimiento que se tenga de la línea celular con la que se esté trabajando y su comportamiento. Se debe tener en cuenta el tiempo de duplicación celular de la línea celular que se esté empleando; en el caso de emplear C2C12¹¹⁵ y RD¹¹⁶ deben tomarse con anterioridad a que completen un ciclo celular de 24 horas.

Existen diferentes modos de analizar estos ensayos; se puede contar el número de células que migran o bien se puede medir el área de la herida. En esta Tesis se utilizó el segundo método de análisis empleando la herramienta del *ImageJ*, conocida como "MRI *Wound Healing Tool*", esta herramienta mide el área que queda vacía o libre de células en cada uno de los tiempos en que se toman imágenes. Puede suceder que, en un mismo tiempo, al analizar una imagen se obtenga más de un área cuando ya están en contacto algunas células de ambos lados, en esos casos, para obtener el área total de ese tiempo, es necesario sumar todas las áreas obtenidas.

3.2.10 Tinción con MitoTracker y DAPI

El *MitoTracker® Red CMXRos* es un colorante fluorescente disponible comercialmente que marca las mitocondrias dentro de células vivas utilizando el potencial de membrana mitocondrial. Este colorante

es químicamente reactivo y se une a los grupos tiol en las mitocondrias, lo que permite su unión permanente y su retención incluso después de la muerte o fijación celular ¹¹⁷. El *MitoTracker* es un colorante catiónico, lipofílico, fluorescente y específico de la mitocondria. Cuando la sonda ingresa a una célula en su forma reducida no fluorescente, es oxidada dentro de la mitocondria, reaccionando específica e irreversiblemente con los grupos tiol de las proteínas mitocondriales.

El DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) es una sonda específica de ADN que forma un complejo fluorescente al unirse en el surco menor de secuencias ricas en A-T del ADN. También puede formar complejos intercalados no fluorescentes con ácidos nucleicos de doble cadena.

Las células fueron cultivadas sobre un cubreobjetos dentro de una caja de Petri de 3 cm de diámetro y sometidas a los tratamientos de interés. Una vez finalizados los tratamientos, se retiró el medio de cultivo y se añadió una solución de *MitoTracker*, preparada a partir de una dilución de la solución stock, en una proporción de 1:15000 µl en medio DMEM sin SFB, a razón de 1 ml por caja de Petri. Las células fueron incubadas con esta solución durante 20-30 minutos, tiempo durante el cual el colorante atravesó pasivamente la membrana plasmática y se acumuló en las mitocondrias activas. Luego, se retiró el medio y se realizaron dos lavados con PBS 1X no estéril.

Las células fueron fijadas con paraformaldehído al 4% durante un máximo de 15 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se permeabilizaron con tritón X-100 al 0.1% en PBS 1X durante 10 minutos. A continuación, las células se incubaron con DAPI durante 5-10 minutos y se lavaron nuevamente con PBS 1X. Finalmente, se realizó el montaje del preparado colocando el cubreobjetos sobre un portaobjetos con ayuda de un medio de montaje, y se sellaron los bordes del cubreobjetos con esmalte.

Microscopía de Epifluorescencia. La microscopía de fluorescencia permite estudiar materiales fluorescentes, ya sea de manera natural (materiales autofluorescentes) o tratados con elementos fluorescentes. Es una técnica poderosa con altos niveles de sensibilidad y resolución microscópica, con múltiples aplicaciones en biología celular y diagnóstico clínico. Los microscopios de epifluorescencia se caracterizan por la formación de imágenes amplificadas, donde la muestra a ser analizada es iluminada con luz incidente y la luz reflejada es la que forma la imagen.

Los preparados se visualizaron en un microscopio de epifluorescencia y se tomaron imágenes de diferentes campos de cada preparado.

3.2.11 Lavado de materiales

Todo aquel material de laboratorio que estuvo en contacto con células se debió sumergir en lavandina al 10% durante al menos 30 minutos y luego se lavó con detergente no iónico, si es posible con la ayuda mecánica de una escobilla siempre y cuando ésta no ralle el material descartable. Luego se enjuagó 10 veces con agua corriente, 3 veces con agua destilada y 3 veces con agua bidestilada. Se dejó secar en estufa a 37 °C.

El lavado de materiales debe considerarse un paso importante del trabajo en el laboratorio, ya que un inadecuado lavado puede afectar nuestros resultados, como ejemplo podemos citar que no se hayan lavado de manera adecuada los tubos de ensayo que fueron empleados durante la cuantificación de proteínas por el método de Bradford, y haya quedado algún remanente de proteínas, por lo que cuando se procede a realizar una nueva cuantificación, al agregar el reactivo correspondiente en el tubo, su color pasa de marrón (color normal del reactivo de Bradford) a azul por la presencia de proteínas en el tubo, lo cual si no es detectado a tiempo constituye un error en nuestros resultados al determinar su absorbancia en el espectrofotómetro.

3.2.12 Análisis estadístico de los resultados

Los resultados se expresan como promedios \pm desvío estándar (DE) y representan la media de al menos dos experimentos independientes con resultados comparables. La comparación de los resultados de la condición control vs. las condiciones tratadas con los compuestos sintetizados, fueron analizadas mediante Test *T de Student*, de dos colas considerándose que las diferencias eran estadísticamente significativas con valores de p<0.05 (*), p<0.01 (**) y p<0.001 (***).

CAPÍTULO 4: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Sección Química

En primer lugar, se procedió a la síntesis del precursor **(1)** del **Esquema 3.1**, la 1,3-dihidroxiacridona (1,3-DHA), a partir del cual se realizó la síntesis de la serie de derivados de acridona (**3a**, **3b**, **3c**, **3d**, **3e** y **3f**).

A continuación, se enumeran los diferentes intentos de síntesis de la 1,3-DHA (1) mediante el empleo de distintos procedimientos experimentales.

1) En un primer intento de síntesis, en el procesamiento del crudo de reacción, se empleó una destilación simple para eliminar el butanol que pudiera haber quedado presente en la mezcla de reacción. Luego, se realizó una digestión con agua caliente para eliminar las sales de zinc, el ácido antranílico y el floroglucinol que pudieran haber quedado sin reaccionar; la mezcla fue filtrada con un embudo Büchner conectado a vacío, obteniéndose un sólido (compuesto orgánico insoluble en agua) que fue lavado con diclorometano (contribuye en la eliminación del remanente de floroglucinol y ácido antranílico) y posteriormente con hexano.

Si bien el objetivo fue obtener 1,3-DHA (1), hay que tener en cuenta que son tres los posibles productos de reacción que derivan de la ciclodeshidratación entre ácido antranílico y floroglucinol (**Figura 4.1**):



Figura 4.1. Posibles productos de la reacción de formación de 1,3-DHA (1).

Al detectar que el producto crudo consistía en una mezcla compleja de compuestos, donde el producto deseado (1,3-DHA) se encontraba en muy baja proporción (monitoreo por CG-EM), se decidió no avanzar con su aislamiento y purificación mediante cromatografía en columna.

En este caso, se puede concluir que la reacción no avanzó lo suficiente debido a la posible hidratación del ZnCl₂, el cual se requiere anhidro para su correcto desempeño como ácido de Lewis (agente deshidratante) en la reacción de ciclodeshidratación. Por este motivo, se decidió explorar otra condición de reacción.

2) En esta oportunidad, se repitió la reacción de síntesis de 1,3-DHA ajustando la cantidad de ZnCl₂ e incorporando variaciones en el procesamiento del producto crudo. Es así como, el crudo de reacción fue tratado con una mezcla de benceno:agua (1:1), con posterior separación de las fases acuosa y orgánica. Los extractos orgánicos se secaron con Na₂SO₄ anhidro, se filtraron y luego se concentraron en un rotaevaporador.

A continuación, se realizó una destilación simple a presión normal, para eliminar los restos de butanol y de benceno. El producto crudo obtenido fue luego sometido a un tratamiento ácido-base: en primer lugar, fue tratado con NaOH 5% y filtrado por succión con un embudo Büchner (esto permitió que los restos de ácido antranílico y floroglucinol se separen del sólido y pasen a la fase acuosa). El sólido obtenido a partir del filtrado fue tratado posteriormente con H₂SO₄ 5% (hasta pH neutro), y nuevamente filtrado. Se obtuvo un sólido oscuro en el cual no se detectó la presencia del compuesto de interés (monitoreo por TLC), por lo que se continuó trabajando con las aguas madres del filtrado, dado que allí se apreciaba la presencia de un sólido.

Las aguas madres provenientes del filtrado se neutralizaron con H₂SO₄ 5%, con el objetivo de que el producto de interés (1,3-DHA) precipite a un pH cercano a la neutralidad. Se dejó decantar y se observó la separación de dos fases: una fase orgánica superior de color amarillo-marrón y una fase acuosa inferior turbia con restos de material sólido que podrían corresponder a las sales orgánicas que no son completamente solubles en la fase acuosa. Una vez separadas las fases, la capa acuosa se filtró, obteniéndose un sólido, el cual se recristalizó con una mezcla de etanol/agua y al no aparecer ningún cristal se dejó concentrar bajo campana obteniéndose un sólido de color amarillo-verdoso. Se realizó una nueva recristalización pero, mediante la realización de una TLC, se pudo constatar que no se trataba del producto esperado, por lo que se repitió la reacción de síntesis de la 1,3-DHA, aunque en esta nueva oportunidad se trabajó a mayor escala.

3) En este nuevo intento de síntesis de la 1,3-DHA **(1)**, el butanol fue removido mediante destilación a presión normal. Luego, se terminó de concentrar a presión reducida empleando un rotaevaporador. Por último, el producto crudo se colocó en una bomba de alto vacío para eliminar cualquier traza de butanol que pudiera haber quedado. El producto crudo se procesó de la siguiente manera: se realizó una digestión con agua caliente, luego se filtró con un embudo Büchner, se dejó secar y luego se lavó con diclorometano; se realizó una TLC y se procedió a realizar su caracterización por RMN, a partir de la cual se pudo concluir que, en esta nueva ocasión, tampoco se logró acceder al producto de interés.

4) En otro intento de síntesis de la 1,3-DHA, la reacción fue llevada a cabo durante 18 horas, detectándose la pérdida de butanol, probablemente debido a fugas en el reactor empleado. Se obtuvo un óleo de color negro, en el que a partir de la TLC se determinó que los reactantes se habían
consumido, indicando que la reacción se había completado. Además, en la TLC se pudo determinar la presencia de compuestos con un mayor Rf (factor de retención), mientras que lo que aparece más retenido en la placa (Rf menor) sería el compuesto de interés: 1,3-DHA (**1**). En esta ocasión, no se destiló el butanol ya que, si bien algo quedó retenido en el sólido, la mayor proporción se evaporó durante la reacción.

En esta oportunidad se realizó una digestión con agua caliente, posteriormente se filtró en embudo Büchner conectado a vacío. El posterior lavado con agua permitió arrastrar los restos de butanol, floroglucinol y ZnCl₂. El sólido obtenido tenía color café. Luego se realizaron lavados con CH₂Cl₂ en embudo Büchner, lo cual permitió arrastrar impurezas, y se secó. Se pudo determinar así, que con algunas variaciones en el procesamiento del crudo de reacción (con respecto a las citadas en el **Esquema 3.2**) se logró arribar al producto de interés. Dado que el compuesto aún presentaba trazas de solvente, no se procedió a su caracterización por técnicas espectroscópicas, por lo que se decidió proseguir con la siguiente etapa de reacción, la cual consistió en una *O*-alquilación selectiva.

Algunas consideraciones respecto de la reacción de O-alquilación:

- El *linker* o espaciador (1,*n*-dibromoalcano) no se agrega en exceso porque la reacción no progresa más de lo necesario y después se torna dificultoso remover su excedente.
- La reacción comienza con el agregado de la base. Si hay presencia de agua en la reacción consumirá la base (por eso se debe realizar una meticulosa limpieza de los materiales a emplear, es decir, el sistema debe encontrarse completamente seco al momento de iniciar la reacción).
- \circ Se agrega una punta de espátula de KI, lo cual permite mejorar la naturaleza del grupo saliente, y así acelerar el mecanismo de S_N2 (sustitución nucleofílica bimolecular) implicado.
- En una primera instancia se agrega 1 equivalente de K₂CO₃ y al cabo de 16 horas de reacción se agrega otro equivalente de base.

En este caso se citará la reacción de *O*-alquilación en presencia de 1,5-dibromopentano. El procesamiento del crudo de reacción obtenido consistió en el tratamiento del mismo con agua helada, posteriormente se filtró y se secó, obteniéndose un sólido amarillo verdoso. Como método de purificación se empleó la cromatografía en columna, en una relación 30:1 (sílica gel:muestra), determinando el avance de la misma por TLC.

Serie eluotrópica empleada en la cromatografía en columna por gradiente de concentración:

• Éter de petróleo (100%): no se detectó aparición de compuestos orgánicos.

- Éter de petróleo:acetato de etilo (95:5): impurezas.
- Éter de petróleo:acetato de etilo (90:10): no se detectó aparición de compuestos orgánicos .
- Éter de petróleo:acetato de etilo (85:15): no se detectó aparición de compuestos orgánicos.
- Éter de petróleo:acetato de etilo (80:20): eluyó un compuesto o mezcla de compuestos, que fue recogido en distintas fracciones, posteriormente se combinaron aquellas fracciones que por TLC parecían tener la misma composición.

El compuesto obtenido con la mezcla de solventes éter de petróleo:acetato de etilo (80:20) demostró no ser soluble en cloroformo, pero sí en DMSO, por lo que se procedió a su caracterización por dilución en este solvente, así se pudo determinar que dicho compuesto era el de interés, pero presentaba impurezas aún después de haber realizado una cromatografía sumamente cuidadosa. En este punto se concluyó que sería muy complejo eliminar esas impurezas y en caso de proceder a la próxima reacción de aminación y colocar el derivado aminado obtenido en la columna para eliminar dichas impurezas mediante otra cromatografía, sería mucho más dificultoso, ya que eluir el producto de interés de la columna sería difícil debido a su elevada polaridad. En base a las conclusiones detalladas, se decidió purificar el crudo inicial de 1,3-DHA, ya que sólo se empleó una fracción para realizar esta reacción de *O*-alquilación.

Se realizó una cromatografía en columna a partir del crudo inicial de 1,3-DHA. Se emplearon las siguientes series eluotrópicas para realizar la cromatografía en columna, indicando lo obtenido en cada eluído:

- Éter de petróleo (100%): no se detectó compuesto orgánico.
- Éter de petróleo:acetato de etilo (90:10): no se detectó compuesto orgánico.
- Éter de petróleo:acetato de etilo (80:20): no se detectó compuesto orgánico..
- Éter de petróleo:acetato de etilo (70:30): no se detectó compuesto orgánico
- Éter de petróleo:acetato de etilo (65:35): eluyó un compuesto o mezcla de compuestos de la columna, que fue recogida en distintas fracciones.
- Éter de petróleo:acetato de etilo (60:40): eluyó un compuesto o mezcla de compuestos de la columna, que fue recogida en diferentes fracciones.
- Éter de petróleo:acetato de etilo (50:50): eluyó un compuesto o mezcla de compuestos de la columna, que fue recogida en distintas fracciones.

Se reunieron aquellas fracciones que de acuerdo a la TLC presentaban la misma composición. Se procedió a su caracterización, y el eluído recogido a partir de las últimas tres mezclas de solvente, se trataba del compuesto del interés **(1)**. La masa perdida durante la cromatografía, resultó ser la cantidad esperable.

Una vez obtenido el producto de partida **(1)**, se continuó con la reacción de *O*-alquilación, en esta oportunidad se describirá la introducción del espaciador de 4 átomos de carbono (1,4dibromobutano), teniendo en cuenta que es más fácil trabajar con este espaciador debido a su mayor volatilidad respecto a los otros dihaloalcanos empleados.

El crudo de reacción proveniente de la *O*-alquilación se filtró y el sólido obtenido (que correspondía a K₂CO₃) fue lavado con acetona para arrastrar la mayor cantidad de compuesto; las aguas madres o el líquido filtrado contienen el compuesto bromado de interés, esta fracción se concentró en rotaevaporador. El exceso de espaciador no pudo ser eliminado en rotaevaporador debido a su elevado punto de ebullición (198 °C a presión normal).

Posteriormente, se purificó el compuesto bromado mediante cromatografía en columna, previo a la reacción de aminación, ya que como se mencionó anteriormente, después de este paso sería muy difícil separar el compuesto aminado por columna debido a su alta polaridad, ya que queda muy retenido en la sílica gel.

Para la cromatografía en columna, se emplea una relación 30:1 de sílica:muestra y la siguiente serie eluotrópica:

- Éter de petróleo (100%): no se detectó compuesto orgánico.
- Éter de petróleo:acetato de etilo (90:10): impurezas.
- Éter de petróleo:acetato de etilo (80:20): eluyó un compuesto o mezcla de compuestos que fue recogida en diferentes fracciones.

La masa obtenida en las distintas fracciones recogidas a partir de la cromatografía en columna no fue suficiente para proceder a su caracterización mediante espectroscopia de resonancia magnética, y aún menos para continuar la reacción. Por lo que se decidió proceder nuevamente con la síntesis del precursor 1,3-DHA (1).

5) En un nuevo intento de síntesis de 1,3-DHA se obtuvo un óleo de color rojizo; en esta ocasión se introdujeron cambios en el procesado del crudo de reacción, ya que se empleó otra forma de remover el butanol, que no sea por destilación simple ya que esta metodología parecería favorecer la aparición de subproductos que generan inconvenientes en las reacciones posteriores. Por lo que, se removió el

butanol empleando una mezcla azeotrópica mediante el agregado de tolueno, teniendo en cuenta los respectivos puntos de ebullición:

Butanol: 117.7 °C

Tolueno: 110.6 °C

Esta mezcla destila a 100 °C a presión normal. Al realizar una destilación a presión reducida en un rotaevaporador, la mezcla destiló a 80 °C.

Posteriormente, se realizó una digestión con agua caliente durante 1 hora con el fin de eliminar el ZnCl₂ y parte del butanol que pudiera haber quedado sin remover. La mezcla fue filtrada con un embudo Büchner conectado a vacío y luego se realizaron lavados con diclorometano. Se realizó su caracterización mediante espectroscopia de resonancia magnética, confirmando de esta forma la identidad del producto de interés.

Luego, se llevó a cabo la reacción de *O*-alquilación, en este caso con 1,4-dibromobutano, reacción que progresó sin inconvenientes. Posteriormente se realizó la reacción de aminación en presencia de morfolina, con la finalidad de obtener el producto **AC4MOR (3a)**. El progreso de la reacción se monitoreó por TLC, empleando como fase móvil (FM) hexano:acetato de etilo (50:50). Cabe señalar que el producto aminado, quedó retenido en el punto de siembra.

El crudo se mezcló con agua helada, obteniéndose así un sólido amarillo, el cual se filtró por gravedad y se concentró bajo campana.

Se determinó el punto de fusión del producto obtenido con un aparato Büchi 530 (Pf: 185-189 °C).

Se realizó una caracterización completa del producto obtenido por RMN, FT-IR. Una vez determinada la estructura y el grado de pureza del compuesto **AC4MOR (3a)**, se procedió a la preparación de una solución del mismo en DMSO, con una concentración 0.0217 M, listo para ser empleado en los ensayos biológicos, cuyos resultados se detallan más adelante.

En cuanto a la reacción de aminación con el espaciador de 5 átomos de carbono, es decir, con el 1,5dibromopentano, no hay mayores consideraciones.

En la reacción de aminación con el espaciador de 6 átomos de carbono, 1,6-dibromohexano, el compuesto bromado obtenido se concentró bajo campana, posteriormente se purificó mediante cromatografía en columna empleando una relación 50:1 de sílica:muestra, empleando la siguiente serie eluotrópica:

• Éter de petróleo (100%): no se detectó compuesto orgánico.

- Éter de petróleo:acetato de etilo (90:10): comenzó a eluir un compuesto o mezcla de compuestos, que fue recogida en distintas fracciones.
- Éter de petróleo:acetato de etilo (85:15): comenzó a eluir un compuesto o mezcla de compuestos, que fue recogida en distintas fracciones. Luego de monitorear por TLC se pudo determinar que dicho compuesto tenía el mismo Rf que el compuesto que eluía en la fracción anterior, con la diferencia de que al visualizar la placa bajo luz UV, presentaban distinto color.

El compuesto obtenido empleando la mezcla de solventes éter de petróleo:acetato de etilo (85:15) se concentró en un rotaevaporador, se agregó hexano para extraer el éter, y finalmente se concentró con una bomba de alto vacío. A partir de la caracterización por RMN se pudo determinar que se trataba del compuesto de interés *O*-alquilado, por lo que se decidió continuar con la reacción de aminación, empleando morfolina como amina.

La reacción se monitoreó mediante TLC. Se vertió el crudo de reacción en agua helada, se filtró por gravedad, y se dejó concentrar bajo campana. Seguidamente se procedió a su caracterización por espectroscopia, donde se detectó un exceso de H aromáticos.

En la TLC, el producto aminado como es de suponer queda retenido en el punto de siembra. Por este motivo el monitoreo luego se realizó por TLC, empleando alúmina y como FM: CH_2Cl_2 (100) ó CH_2Cl_2 :metanol (98:2).

Como método de purificación, se realizó una cromatografía en columna percolada con una menor relación de sílica gel con respecto a la muestra (20:1). Para esto se empleó una columna pequeña, sin llave, con la limitante de que no se puede regular el goteo. Se empleó la siguiente serie eluotrópica:

- Éter de petróleo:acetato de etilo (70:30): impureza.
- Éter de petróleo:acetato de etilo (50:50): impureza.
- Diclorometano (100%): impureza.
- Diclorometano:metanol (50:50): eluyó un compuesto o mezcla de compuestos, que fue recogida en distintas fracciones, de las cuales una de ellas presentaba una separación en dos fases, que resulta ser el compuesto de interés, mientras que el resto de las fracciones no contiene ningún compuesto orgánico según la TLC.
- Metanol (100%): no se observa presencia de compuesto orgánico por TLC.

El tubo con el compuesto de interés, que se obtuvo con la fracción diclorometano:metanol (50:50), se concentró en un rotaevaporador y finalmente con una bomba de alto vacío se eliminaron las trazas de solvente. Su punto de fusión fue de 170-175 °C.

Se realizó la caracterización estructural del compuesto **AC6MOR (3f)**, mediante el empleo de diferentes técnicas espectroscópicas, pudiendo constatar la identidad del mismo y su alto grado de pureza.

Por último, se preparó una solución en DMSO, que se empleó en los ensayos biológicos, como se verá a continuación, cuya concentración final fue de 0.0217 M.

Con respecto al procedimiento de síntesis del derivado de xantona **(6)**, se empleó un protocolo desarrollado en el grupo de investigación ⁷, por lo que no hubo mayores inconvenientes en acceder a la formación del mismo.

4.2 Ensayos biológicos

Como se detalló en la introducción, se trabajó con dos modelos experimentales que son dos líneas celulares: RD (células de RMS de origen humano) y C2C12 (células de músculo esquelético no patológico de origen murino). Las células fueron sembradas en medio DMEM con alta concentración de glucosa y con 10% de SFB, el medio fue renovado cada 48 horas previniendo el agotamiento de nutrientes. Previo a realizar los tratamientos correspondientes, se realizó la deprivación de suero con el fin de sincronizar a todas las células en la misma fase del ciclo celular para que recibieran todas de igual manera el tratamiento que se realizó posteriormente con los compuestos de interés.

Para realizar los tratamientos con los compuestos se utilizaron células crecidas hasta un 70-80% de confluencia.

El aprendizaje del manejo de células implicó que en varias ocasiones se debiera descartar los modelos experimentales debido a diversas causas: la puesta a punto de una técnica, problemas de contaminación o debido a que la cuantificación de proteínas arrojó valores bajos o insuficientes para realizar ensayos *Western Blot*.

En todos los experimentos realizados en el marco de este Trabajo de Tesis Doctoral, tanto las condiciones control como las tratadas con los diversos compuestos, fueron estandarizadas y ensayadas en presencia de un 10% de SFB, proporción necesaria para garantizar el crecimiento y la viabilidad de las células. Además, el SFB al 10% es un estímulo que aumenta la activación de Akt en células RD como así también se ha observado para otras líneas celulares ^{118,119}. Se utilizó como control una condición conteniendo 10% de SFB y DMSO, que actuó como vehículo de todos los compuestos sintetizados. La concentración de DMSO empleada en el control fue la misma a la utilizada en la condición con la mayor concentración de compuesto ensayado. Al comparar las condiciones tratadas con los compuestos vs. el control con DMSO se asegura que cualquier efecto observado no es producto de la presencia del DMSO, sino por la acción de los compuestos.

En el caso del uso de los compuestos a concentraciones mayores a 20 µM, la proporción final de DMSO fue de 0.18%, lo que ha sido informado con acciones tóxicas en varios tipos celulares. Por esto, en otros ensayos realizados en este Trabajo de Tesis Doctoral se tuvo en cuenta que el porcentaje de DMSO final no fuera superior a 0.1% para garantizar que este solvente no tuviera acciones *per se*. Dado que los nóveles compuestos sintetizados no han sido previamente evaluados en ningún sistema biológico, al comenzar con los experimentos, se realizó algunos estudios tiempo y dosis respuesta con los compuestos y a partir de allí, se eligieron tiempos y dosis de ensayos para realizar el resto de las investigaciones.

4.2.1 Primer abordaje de las acciones de los compuestos AC5DIE y AC5MOR en la línea celular tumoral

En una primera instancia, habiendo logrado la síntesis exitosa de los compuestos **AC5DIE (3b)** y **AC5MOR (3c)**, se evaluó su potencial en células RD. Se determinó la acción de estos compuestos como posibles inhibidores de PI3K/PDK1/Akt mediante ensayos de *Western Blot*. Debido a que no existe información previa de las acciones de estos compuestos ya que son únicos y se han sintetizado por primera vez en el desarrollo de este Trabajo de Tesis Doctoral, inicialmente se evaluaron dos dosis (10 y 20 µM) a 60 minutos de tratamiento. Para el diseño experimental se emplearon las siguientes condiciones:

- 1) DMSO
- 2) AC5DIE (3b)10 µM
- 3) AC5DIE (3b) 20 µM
- 4) AC5MOR (3c) 10 µM
- 5) AC5MOR (3c) 20 µM

Luego de llevar a cabo los ensayos *Western Blot*, las membranas obtenidas fueron incubadas con distintos anticuerpos. El uso de los anticuerpos contra PI3K p110, PI3K p85α y p-p53 no arrojaron resultados, pero sí obtuvimos datos al utilizar el anticuerpo contra la Ser473 fosforilada de Akt (p-Akt), obtenido de *Cell Signalling Technology*, Inc. (Beverly, MA, USA), lo que permitió determinar cambios en la activación de esta quinasa ¹²⁰. El anticuerpo anti-GAPDH fue empleado como control de siembra. Los resultados obtenidos se pueden observar en la **Figura 4.2**.



Figura 4.2. Cambios en la fosforilación de Akt en la línea celular RD ejercida por los compuestos **3b** y **3c** a 60 minutos de tratamiento. Se utilizaron los anticuerpos anti-fosfo Ser473 Akt (p-Akt) y anti-GAPDH. Este último permite asegurar una carga igualitaria de proteína en todas las condiciones. Los gráficos de barras muestran la cuantificación de p-Akt/GAPDH. La condición que corresponde a 10 μM de **3b** no se encuentra en la Figura ya que no se sembró en el gel una adecuada cantidad de proteínas que permitiera visualizar resultados. Se muestran los *blots* correspondientes. Este ensayo se realizó una única vez.

Si bien la **Figura 4.2** no cuenta con análisis estadístico, podemos observar que los compuestos **3b** (20 μM) y **3c** (10 y 20 μM) provocan una disminución en la fosforilación de Akt, con respecto a la condición control.

Habiendo observado las acciones de los compuestos sobre la activación de Akt, se realizaron estudios de viabilidad celular en la línea celular RD, empleando las siguientes condiciones:

- 1) DMSO
- 2) AC5DIE (3b) 10 µM
- 3) AC5DIE (3b) 20 µM

- 4) AC5MOR (3c) 10 µM
- 5) **AC5MOR (3c)** 20 μM
- 6) 10% SFB

Todas las condiciones fueron ensayadas a 24 horas, ya que previamente se ha reportado que las células RD se duplican cada 24 horas ¹¹⁶. La viabilidad celular se determinó empleando el colorante azul de tripán, con posterior recuento de células vivas y muertas en cámara de Neubauer. Los resultados obtenidos se muestran en la **Figura 4.3**.



Figura 4.3. Efecto de los compuestos **3b** y **3c** empleados en concentraciones de 10 y 20 μM sobre la viabilidad de la línea celular RD. Se contaron las células muertas (teñidas con azul de tripán) y las células vivas (que excluyeron el colorante) utilizando una cámara de Neubauer. El gráfico de barras muestra los resultados cuantitativos del número de células de dos experimentos independientes. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 vs. control.

Los resultados muestran una gran variabilidad entre las réplicas y esto es algo que suele ocurrir al realizar esta técnica. A partir de los resultados obtenidos se puede determinar que el compuesto **3c** a 20 µM, causa una disminución significativa en la viabilidad de las células de RMS, lo cual resulta promisorio ya que se busca que estos nóveles compuestos puedan ser desarrollados a futuro como agentes anticáncer. El hecho de que **3c** (20 µM) también haya disminuido la activación de Akt está en concordancia con los eventos de muerte que ocurren en el interior de células cancerosas ^{67,121}. Como se ha reportado, al inhibirse Akt se desencadenan varios eventos que llevan a la muerte celular, principalmente a través de mecanismos como la apoptosis (muerte celular programada). Por ejemplo, al suprimir la activación de Akt, se altera la función mitocondrial, se generan especies reactivas de

oxígeno (ROS), y se activan las caspasas, que son enzimas clave en el proceso de apoptosis. Este proceso es de particular interés en el tratamiento del cáncer, ya que la inhibición de Akt sensibiliza a las células tumorales a las terapias convencionales como la quimioterapia y radioterapia. Se ha observado que ciertos compuestos (como Shikonin) inducen apoptosis a través de la inhibición de la vía de Akt, lo que sugiere que la inhibición de Akt puede promover la muerte celular en tumores resistentes ¹²².

Luego se evaluó un mayor rango de concentraciones (10, 20 y 50 µM) para los compuestos **3b** y **3c**, con el fin de obtener una visión general de los efectos que ocurren en las diferentes condiciones experimentales. En este caso se realizó un tratamiento de 90 minutos de duración en la línea celular RD. Se emplearon las siguientes condiciones:

- 1) DMSO
- 2) AC5DIE (3b)10 µM
- 3) AC5DIE (3b) 20 µM
- 4) **AC5DIE (3b)** 50 μM
- 5) AC5MOR (3c) 10 µM
- 6) **AC5MOR (3c)** 20 μM
- 7) **AC5MOR (3c)** 50 µM

Los resultados obtenidos se observan en la Figura 4.4.



Figura 4.4. Cambios en la fosforilación de Akt en la línea celular RD ejercida por los compuestos **3b** y **3c** a 90 minutos de tratamiento. Se utilizó un anticuerpo anti-fosfo Ser473 Akt (p-Akt). El anticuerpo anti-GAPDH fue usado para asegurar una carga igualitaria de proteína en todas las condiciones. Los gráficos de barras muestran la cuantificación de p-Akt/GAPDH. Se muestran los *blots* correspondientes. Este ensayo se realizó una única vez.

El análisis de estos resultados permite deducir que el tratamiento a mayor tiempo (90 minutos) logra una mayor disminución de la activación de Akt (excepto en el caso del compuesto **3b** a 10 μ M, ya que presenta un comportamiento similar al control). En la **Figura 4.4** se puede observar además una mayor disminución en la fosforilación de Akt a medida que se emplean mayores concentraciones de ambos compuestos, alcanzando la máxima disminución en la activación de Akt con las concentraciones de 50 μ M de ambos compuestos.

La inesperada acción del compuesto **3b** a una concentración de 10 µM, podría deberse al hecho de que esa condición presentaba células no responsivas que no mostraban cambios fenotípicos en la observación al microscopio que se realiza siempre en forma previa al inicio de los experimentos.

Seguidamente, los compuestos **3b** y **3c**, fueron ensayados en células de músculo esquelético no patológico de origen murino (línea C2C12), para poder evaluar sus efectos en el fenotipo normal de músculo esquelético.

4.2.2 Efectos producidos por los compuestos AC5DIE y AC5MOR en la línea celular normal

Teniendo en cuenta protocolos de trabajo anteriormente usados para este modelo experimental ^{70,115,123}, las células fueron deprivadas de SFB a fin de ser sincronizadas y luego se realizaron las siguientes condiciones experimentales:

- 1) DMSO
- 2) AC5DIE (3b) 10 µM
- 3) AC5DIE (3b) 20 µM
- 4) AC5DIE (3b) 50 µM
- 5) AC5MOR (3c) 10 µM
- 6) AC5MOR (3c) 20 μM
- 7) **AC5MOR (3c)** 50 μM

Se emplearon distintos tiempos de tratamiento, períodos de tratamiento cortos (30 y 90 minutos) y largos (24 y 48 horas), para evaluar los cambios en la activación de Akt.

En primer lugar, se realizó el tratamiento durante 30 minutos, cuyos resultados se muestran en la **Figura 4.5**.



Figura 4.5. Cambios en la fosforilación de Akt en la línea celular C2C12 ejercidos por los compuestos **3b** y **3c** a 30 minutos de tratamiento. Se utilizó el anticuerpo anti-fosfo Ser473 Akt (p-Akt) y anti- β tubulina para asegurar una carga igualitaria de proteína en todas las condiciones. Los gráficos de barras muestran la cuantificación de p-Akt/ β tubulina. Se muestran *blots* representativos de dos experimentos independientes. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 vs. control.

Se observa que, a 30 minutos de tratamiento, el compuesto **3b** cuando es empleado a una concentración de 50 μ M provoca una disminución significativa en la activación de Akt, mientras que no se observa este efecto a 20 μ M, como ocurría en las células RD. Los demás tratamientos no causan un efecto significativo.

El mismo ensayo se llevó a cabo durante 90 minutos, los resultados obtenidos se muestran en la **Figura 4.6**.



Figura 4.6. Cambios en la fosforilación de Akt en la línea celular C2C12 ejercida por los compuestos **3b** y **3c** a 90 minutos de tratamiento. El ensayo se realizó utilizando un anticuerpo anti-fosfo Ser473 Akt (p-Akt). Se utilizó anti-βtubulina para asegurar una carga igualitaria de proteína en todas las condiciones. Los gráficos de barras muestran la cuantificación de p-Akt/βtubulina. Se muestran *blots* representativos de dos experimentos independientes. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 vs. control.

Los resultados obtenidos evidencian que en alguna de las réplicas realizadas en presencia de 10% de SFB y DMSO las células no estuvieron responsivas y esto provoca el gran desvío estándar producto de las comparaciones. El análisis de la **Figura 4.6** muestra que hay un efecto inhibitorio por parte de **3b** y **3c** cuando son empleados a la concentración de 50 µM, así como también una inhibición significativa por parte de **3c** cuando es empleado a 10 µM.

Seguidamente, se realizaron los tratamientos durante 24 horas cuyos resultados se muestran en la **Figura 4.7**.



Figura 4.7. Cambios en la fosforilación de Akt en la línea celular C2C12 ejercida por los compuestos **3b** y **3c** a 24 horas de tratamiento. El ensayo se realizó utilizando un anticuerpo anti-fosfo Ser473 Akt (p-Akt). Se utilizó anti- β tubulina para asegurar una carga de proteína igual en todas las condiciones. Los gráficos de barras muestran la cuantificación de p-Akt/ β tubulina. Se muestran *blots* representativos de dos experimentos independientes. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 vs. control.

El compuesto **3c** a una concentración de 10 μ M, tal como se observó a 90 minutos de tratamiento, provoca una disminución en la activación de Akt cuando el tratamiento es prolongado durante 24 horas, este efecto no se reproduce en las condiciones que presentan una mayor concentración de este compuesto, puede ser que en dichas condiciones las células no se encontraban responsivas, lo que explicaría el gran desvío observado cuando el compuesto **3c** es empleado en una concentración de 50 μ M. Por otro lado, el tratamiento con el compuesto **3b** no produjo variaciones significativas en la activación de Akt con ninguna de las concentraciones evaluadas a 24 horas de tratamiento.

Seguidamente, los tratamientos fueron realizados durante 48 horas. Los resultados se muestran en la **Figura 4.8**.



Figura 4.8. Cambios en la fosforilación de Akt en la línea celular C2C12 ejercida por los compuestos **3b** y **3c** a 48 horas de tratamiento. Se utilizó un anticuerpo anti-fosfo Ser473 Akt (p-Akt) y anti-βtubulina para asegurar una igual cantidad de proteínas en todos los carriles. Los gráficos de barras muestran los resultados cuantitativos de p-Akt/βtubulina. Se muestran *blots* representativos de dos experimentos independientes.

Los distintos tratamientos no causaron diferencias significativas en la fosforilación y consiguiente activación de Akt, con respecto al control. Esto pudo deberse a la variabilidad entre los distintos experimentos que provoca desviaciones estándar muy elevadas. Sin embargo, a partir de la **Figura 4.8** puede observarse una disminución en la activación de Akt por parte de los compuestos **3b** (50 µM) y **3c** (10 µM), aunque no llega a ser significativa debido a lo expuesto previamente.

4.2.3 Evaluación de los compuestos AC5DIE, AC5MOR, AC5PIR y AC5PIP en C2C12

Posteriormente, se realizaron experimentos en la línea celular C2C12, en los que además de evaluar los efectos producidos por los compuestos **AC5DIE (3b)** y **AC5MOR (3c)**, también se emplearon los derivados de acridona **AC5PIR (3d)** y **AC5PIP (3e)**, como posibles inhibidores de PI3K/PDK1/Akt.

La obtención de estos nuevos compuestos presenta el desafío de tener que evaluarlos en concentraciones menores (0.5 y 1.0 μ M), ya que el hecho de emplear mayores concentraciones de estos compuestos implicaba agregar una mayor proporción de DMSO a los cultivos pudiendo en algún momento manifestarse los efectos tóxicos del mismo. Existe información indicando que la concentración de DMSO no debe ser mayor de 0.1%, ya que previamente se ha demostrado efectos indeseables del DMSO cuando es empleado en concentraciones mayores en células musculares ¹²⁴. Debido a la rigurosidad científica empleada en la elección de los abordajes experimentales, los siguientes ensayos de este Trabajo de Tesis Doctoral se realizaron usando las nuevas concentraciones sugeridas.

Se evaluaron las siguientes condiciones experimentales:

- 1) DMSO
- 2) AC5DIE (3b) 0.5 µM
- 3) **AC5DIE (3b)** 1.0 μM
- 4) AC5MOR (3c) 0.5 µM
- 5) AC5MOR (3c) 1.0 µM
- 6) AC5PIR (3d) 0.5 μM
- 7) AC5PIR (3d) 1.0 µM
- 8) **AC5PIP (3e)** 0.5 μM
- 9) AC5PIP (3e) 1.0 µM

Los tratamientos fueron realizados a 15 y 30 minutos, en la línea celular C2C12, por triplicado. Los resultados obtenidos luego del tratamiento a 15 minutos se pueden observar en la **Figura 4.9**.



Figura 4.9. Cambios en la fosforilación de Akt en la línea celular C2C12 ejercida por los compuestos **3b, 3c, 3d** y **3e** a 15 minutos de tratamiento. Se utilizó un anticuerpo anti-fosfo Ser473 Akt (p-Akt) y un anti-GADPH para asegurar una carga proteica equivalente en todas las calles del gel. Los gráficos de barras muestran los resultados cuantitativos de p-Akt/GADPH. Se muestran *blots* representativos de tres experimentos independientes. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 vs. control.

El tratamiento con los compuestos **3c** y **3d** (1.0 μ M) durante 15 minutos, produjo una disminución significativa en la activación de Akt. Por otro lado, el compuesto **3e** empleado en una concentración de 0.5 μ M, parecería disminuir la activación de esta quinasa, pero la diferencia entre experimentos no permite evidenciar un efecto significativo.

Con respecto al tratamiento llevado a cabo durante 30 minutos, los resultados se pueden observar en la **Figura 4.10.**



Figura 4.10. Cambios en la fosforilación de Akt en la línea celular C2C12 ejercida por los compuestos **3b, 3c, 3d** y **3e** a 30 minutos de tratamiento. Se utilizó un anticuerpo anti-fosfo Ser473 Akt (p-Akt) y un anti-GADPH para asegurar una carga proteica equivalente en todas las calles del gel. Los gráficos de barras muestran los resultados cuantitativos de p-Akt/GADPH. Se muestran *blots* representativos de tres experimentos independientes.

El tratamiento realizado durante 30 minutos no provocó cambios significativos sobre la fosforilación y consiguiente activación de Akt. Al igual que el tratamiento a 15 minutos, a 30 minutos el compuesto **3e**

a una concentración de 0.5 μ M pareciera disminuir la activación de esta quinasa, sin embargo la diferencia entre experimentos no permite observar un efecto significativo.

Posteriormente, se realizaron ensayos de viabilidad celular con los últimos dos inhibidores que se incorporaron, **3d** y **3e**, las condiciones experimentales fueron las siguientes:

- 1) DMSO
- 2) AC5PIR (3d) 0.5 µM
- 3) AC5PIR (3d) 1.0 µM
- 4) AC5PIP (3e) 0.5 µM
- 5) AC5PIP (3e) 1.0 µM
- 6) LY294002 10 µM

Se determinó la viabilidad celular empleando el colorante azul de tripán. El tratamiento fue realizado a tiempos de 24 y 48 horas. En esta ocasión se incorporó además, el inhibidor comercial de PI3K/Akt, LY294002 a una concentración de 10 µM, como control positivo de inhibición de Akt, debido a evaluaciones previas realizadas¹²³. Los resultados obtenidos durante 24 horas de tratamiento se muestran en la **Figura 4.11**.





Se pudo determinar que los distintos tratamientos no provocaron cambios sobre la viabilidad de las células de músculo esquelético luego de 24 horas de tratamiento. Además, el número de células

muertas tampoco resultó significativo. Se observa una gran variabilidad entre experimentos, la cual se evidencia debido a los grandes desvíos que se pueden observar en la **Figura 4.11**, esto puede ser el resultado de células que no se encontraron siempre responsivas ni en las mismas condiciones para recibir los tratamientos, diferencias que no se pueden detectar observando al microscopio.

Luego se emplearon tratamientos de 48 horas de duración para evaluar la viabilidad celular en C2C12. Los resultados se pueden observar en la **Figura 4.12.**



Figura 4.12. Efecto de los compuestos **3d** y **3e** sobre la viabilidad celular en la línea celular C2C12, durante 48 horas de tratamiento. Se contaron las células muertas (teñidas con azul de tripán) y las células vivas (que excluyeron el colorante) utilizando una cámara de Neubauer. El gráfico de barras muestra los resultados cuantitativos del número de células de dos experimentos independientes. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 vs. control.

Se puede observar que el tratamiento con los compuestos provoca una disminución significativa en la viabilidad celular de C2C12 luego de 48 horas de tratamiento, con respecto al control. El compuesto **3d** provoca una disminución altamente significativa en la viabilidad celular dependiente de su concentración, ya que a 1.0 µM se observa una disminución aún más marcada en la activación de Akt con respecto a la menor concentración usada. Por otro lado, el compuesto **3e** también reduce la viabilidad celular en forma significativa a la concentración de 1.0 µM.

Con respecto al número de células muertas, no fue significativo, y tampoco hubo diferencias significativas entre los distintos tratamientos.

Luego de analizar cómo los compuestos **3d** y **3e** modulaban la activación de Akt y afectaban la viabilidad celular, se procedió a evaluar sus efectos sobre la fosforilación de ERK (p-ERK). Esta quinasa

es un componente clave de la vía MAPK, involucrada en la proliferación, diferenciación y supervivencia celular. El análisis de p-ERK permite explorar si los compuestos desencadenan respuestas adicionales a las observadas a través de la vía de Akt, brindando una perspectiva más amplia sobre su mecanismo de acción. Las condiciones experimentales fueron las siguientes:

- 1) DMSO
- 2) AC5PIR (3d) 0.5 µM
- 3) AC5PIR (3d) 1.0 µM
- 4) AC5PIP (3e) 0.5 μM
- 5) AC5PIP (3e) 1.0 µM

Los resultados se pueden observar en la Figura 4.13 (A y B).





Figura 4.13. Efectos en la fosforilación de ERK1/2 desencadenados por el tratamiento con **3d** y **3e** en la línea celular C2C12 a 24 **(A)** y 48 horas **(B)**. El *Western blot* se realizó utilizando un anticuerpo antifosfo-ERK1/2. Se empleó anti-GAPDH para asegurar una igual carga de proteína en todas las calles del gel. Los gráficos de barras muestran la cuantificación de p-ERK1/2/GADPH. Representan la media + desviación estándar de dos experimentos independientes. El tratamiento a 48 horas fue realizado por única vez.

Luego del tratamiento a 24 horas no se observan cambios significativos sobre la activación de ERK con ninguno de los compuestos empleados, debido a la alta variabilidad entre los ensayos, probablemente las células de algunas condiciones experimentales no se encontraron responsivas al momento de recibir el tratamiento correspondiente. Con respecto al tratamiento a 48 horas, si bien carece de réplicas, parece que el compuesto **3e** en ambas concentraciones reduce de manera considerable la activación de ERK, este efecto es mucho menor en el caso del tratamiento con **3d** y sólo considerando la menor concentración.

Los compuestos **3d** y **3e** no fueron incorporados en los experimentos que siguen, las investigaciones se continuaron con **3a**, **3b**, **3c** y **3f**. Esto se fundamenta en los resultados preliminares, la eficacia de los compuestos y la necesidad de la optimización de recursos. Los compuestos **3d** y **3e** provocaron una

disminución significativa en la viabilidad celular de la línea celular normal, la falta de una inhibición estadísticamente significativa y considerable de la fosforilación de Akt (sólo **3d** a 1.0 µM durante 15 minutos, disminuyó la activación de Akt) y ERK en la línea celular C2C12 y los efectos citotóxicos potenciales sugirieron que estos compuestos tenían un potencial biológico menor en comparación con **3b** y **3c**. Los estudios preliminares sugieren que los compuestos **3d** y **3e** podrían no actuar directamente sobre la vía PI3K/PDK1/Akt, ya que no inhibieron de manera significativa y considerable la fosforilación de Akt en las condiciones evaluadas. El objetivo de este Trabajo de Tesis Doctoral es hallar compuestos que funcionen como inhibidores de la activación de Akt y que disminuyan la viabilidad de células tumorales, evitando estos efectos sobre las células normales (es decir se busca mejorar la selectividad del tratamiento, minimizando el daño a las células sanas), objetivo al cual apuntan muchas investigaciones actuales ¹²⁵. Debido a esto, se decidió no incluir los compuestos **3d** y **3e** en los experimentos subsiguientes, permitiendo concentrar los recursos en la evaluación de los compuestos más efectivos y en los nuevos inhibidores por descubrir y últimos en ser sintetizados, como **3a** y **3f**.

4.2.4 Efectos de los compuestos AC4MOR, AC5DIE, AC5MOR y AC6MOR sobre la viabilidad celular de células normales de músculo esquelético y células de RMS.

En la búsqueda de nuevos inhibidores de PI3K/PDK1/Akt que no afectaran la viabilidad de las células sanas, se evaluó la respuesta celular a los compuestos **AC4MOR (3a)**, **AC5DIE (3b)**, **AC5MOR (3c)** y **AC6MOR (3f)** empleados a una concentración de 1.0 μ M y además se compararon con el conocido inhibidor LY294002 (10 μ M) durante 24 y 48 horas de tratamiento, en las líneas celulares C2C12 y RD. Las condiciones experimentales fueron las siguientes:

- 1) Basal
- 2) DMSO
- 3) AC4MOR (3a) 1.0 µM
- 4) AC5DIE (3b) 1.0 µM
- 5) AC5MOR (3c) 1.0 µM
- 6) AC6MOR (3f) 1.0 μM
- 7) LY294002 10 µM

Dado que los compuestos **3a** y **3f** también se encuentran vehiculizados en DMSO, se utilizaron condiciones con el agregado de este solvente (<0.1%) para descartar los efectos *per se* de este compuesto. También se incluyó una condición sin ningún tratamiento (Basal). Las células vivas y muertas se contaron utilizando la técnica de tinción con *Trypan Blue* (azul de tripán). Cabe destacar

que en este ensayo, se decidió solo evaluar la mayor concentración de cada compuesto, ya que si el compuesto no ejerce efectos tóxicos a la mayor concentración (1.0 µM), tampoco lo hará a una menor concentración. La **Figura 4.14** muestra que no hubo diferencias significativas en el número de células vivas en todas las condiciones estudiadas a las 24 y 48 horas en las células C2C12. Además, el porcentaje promedio de células muertas fue inferior al 1% en todas las condiciones por lo que no se registran en la figura.



Figura 4.14. Efecto de los compuestos **3a**, **3b**, **3c** y **3f** sobre la viabilidad celular en la línea celular C2C12. Las células se cultivaron en medio de crecimiento hasta alcanzar el 70% de confluencia y se privaron de suero durante 24 horas para sincronizarlas. Posteriormente, se incubaron durante 24 y 48 horas en medio de crecimiento solo (Basal), con DMSO (<0.1%, control), **3a**, **3b**, **3c** y **3f** (1.0 μ M) o LY294002 (10 μ M). Se contaron las células muertas (teñidas con azul de tripán) y las células vivas (que excluyeron el colorante) utilizando una cámara de Neubauer. El gráfico de barras muestra los resultados cuantitativos de tres experimentos independientes. No se observaron diferencias significativas en el número de células viables entre todas las condiciones en los dos tiempos analizados.

Posteriormente, utilizando el mismo enfoque, se investigaron las acciones de los compuestos **3a**, **3b**, **3c** y **3f** (1.0 μ M), el vehículo DMSO y LY294002 (10 μ M) en células de RMS, a las 24 y 48 horas. Como se muestra en la **Figura 4.15**, no se observaron diferencias significativas en el número de células viables entre todas las condiciones en los dos tiempos analizados. Nuevamente, el porcentaje promedio de células muertas en todas las condiciones fue inferior al 1% (datos que no se han incorporado en el gráfico). Los resultados muestran además, como se sospechaba, que las células duplican su población cada 24 horas, al igual que lo que se había determinado previamente para las células de

músculo esquelético normal. El análisis de estas figuras permite concluir que los nuevos compuestos no son citotóxicos para estas líneas celulares (**Figura 4.14** y **Figura 4.15**).



Figura 4.15. Efecto de los compuestos **3a**, **3b**, **3c** y **3f** sobre la viabilidad celular en la línea celular RD. Las células se cultivaron en medio de crecimiento hasta alcanzar una confluencia del 70% y se privaron de suero durante 24 horas para sincronizarlas. Posteriormente, se incubaron durante 24 y 48 horas en medio de crecimiento solo (Basal), con DMSO (<0.1%, control), **3a**, **3b**, **3c** y **3f** (1.0 μ M) o LY294002 (10 μ M). Se contaron las células muertas (teñidas con azul de tripán) y las células vivas (que excluyeron el colorante) utilizando una cámara de Neubauer. El gráfico de barras muestra los resultados cuantitativos de tres experimentos independientes. No se observaron diferencias significativas en el número de células viables entre todas las condiciones en los dos tiempos analizados.

4.2.5 Cambios en la fosforilación de Akt (activación) inducidos por los compuestos AC4MOR, AC5DIE, AC5MOR y AC6MOR en células normales y cancerosas

Previamente, se determinó que dos inhibidores comerciales de PI3K/Akt (LY294002 y Wortmanina) en una concentración de 10 µM inhiben exitosamente la activación de Akt promovida por el SFB al 10%, mientras que los niveles de expresión de Akt permanecen constantes durante la proliferación celular de la línea C2C12 ¹²³. Kilic-Eren y colaboradores informaron que el nivel basal de Akt activa en células de RMS es elevado y que LY294002 a una concentración de 10 µM, inhibe la activación de Akt ¹²⁰. Dado que los nuevos derivados de 1,3-DHA: **AC4MOR (3a)**, **AC5DIE (3b)**, **AC5MOR (3c)** y **AC6MOR (3f)** no fueron citotóxicos ya que no provocaron cambios en la viabilidad celular, se evaluó si estos compuestos eran capaces de inhibir la actividad de Akt en células C2C12 y RD, comparando con la

acción inhibidora de 10 µM de LY294002. Se realizaron ensayos de *Western blot* utilizando el anticuerpo anti p-Akt que reconoce únicamente Akt en su forma fosforilada en Ser-473 (Akt activa), como se reportó anteriormente.

Se evaluaron los cambios en la activación de Akt en células C2C12 tratadas con **3b**. Las condiciones experimentales fueron las siguientes:

- 1) DMSO
- 2) AC5DIE (3b) 0.5 µM
- 3) AC5DIE (3b) 1.0 µM
- 4) LY294002 10 µM

La **Figura 4.16** muestra las variaciones en la fosforilación de Akt en células C2C12 tratadas durante 24 y 48 horas. Los resultados evidencian que **3b** inhibe exitosamente la fosforilación de Akt en ambas concentraciones y tiempos explorados (**Figura 4.16** y **Tabla 4.17**). De relevancia, **3b** (0.5 µM) se comportó como un inhibidor de Akt más exitoso que el compuesto disponible comercialmente (LY294002).



Figura 4.16. Cambios en la fosforilación de Akt inducidos en células C2C12 por **3b** durante 24 y 48 horas. Se utilizó el anticuerpo anti-p-Akt y un anti-GADPH para asegurar una igual cantidad de proteínas en todas las calles del gel. Los gráficos de barras representan las cuantificaciones de p-

Akt/GADPH. Se muestran *blots* representativos de tres experimentos diferentes. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 vs. control.

Tiempo (horas)	24		48	
Condiciones	Inhibición (% ± DE)	p-valor (vs. DMSO)	Inhibición (% ± DE)	p-valor (vs. DMSO)
3b 0.5 μM	85.5 ± 2.9	9.10E-05	85.3 ± 4.5	0.0099
3b 1.0 μM	81.0 ± 10.8	0.0099	58.9 ± 1.5	0.0174
LY294002 10 µM			78.3 ± 4.7	0.0119

Tabla 4.17. Porcentaje de inhibición de Akt ejercido por **3b** en células C2C12. Se muestra el porcentaje± desvío estándar (DE) y p-valor de la prueba *t-Student* vs. la condición con DMSO (Control).

El compuesto **3b** inhibió la activación de Akt exitosamente; el mayor porcentaje de inhibición (85.5%) se observó con **3b** a 0.5 μM durante 24 horas (**Tabla 4.17**); por lo que posteriormente se exploró parte de la serie extendida de derivados de 1,3-DHA.

Las condiciones experimentales fueron las siguientes:

- 1) DMSO
- 2) AC4MOR (3a) 0.5 µM
- 3) AC5MOR (3c) 0.5 µM
- 4) AC6MOR (3f) 0.5 µM
- 5) AC4MOR (3a) 1.0 µM
- 6) AC5MOR (3c) 1.0 μM
- 7) AC6MOR (3f) 1.0 µM

La **Figura 4.18** muestra los resultados obtenidos también en células C2C12 tratadas con estos derivados de 1,3-DHA durante 24 horas. Este gráfico permite determinar claramente que **3a** (a 0.5 μ M y 1.0 μ M) y **3c** (0.5 μ M) inhibieron significativamente la fosforilación de Akt, mientras que **3f** (0.5 μ M) presentó un menor poder inhibitorio (**Tabla 4.19**).



Figura 4.18. Cambios en la fosforilación de Akt en células C2C12 inducidos por los compuestos **3a**, **3c** y **3f**, durante 24 horas. Se utilizó un anticuerpo anti-p-Akt y un anti-GADPH para asegurar una igual cantidad de proteínas en todas las calles del gel. Los gráficos de barras representan las cuantificaciones de p-Akt/GADPH. Se muestran *blots* representativos de tres experimentos independientes. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 vs. control.

Tiempo (horas)	24	
Condiciones	Inhibición	p-valor
	$(\%\pm DE)$	(vs. DMSO)
3a 0.5 μΜ	44.1 ± 3.8	0.0037
3c 0.5 μΜ	56.9 ± 3.4	0.0018
3f 0.5 μΜ	30.9 ± 7.6	0.0288
3a 1.0 μM	71.5 ± 6.7	0.0043
3c 1.0 μM		
3f 1.0 μΜ	45.9 ± 27.0	0.1382

Tabla 4.19. Porcentaje de inhibición de Akt ejercida por los compuestos **3a**, **3c** y **3f** en células C2C12 a 24 horas de tratamiento. Se muestra el porcentaje ± desvío estándar (DE) y p-valor de la prueba *t-Student* vs. la condición con DMSO (Control).

Los resultados obtenidos en células C2C12 expuestas a los compuestos **3a**, **3c** y **3f** durante 48 horas se observan en la **Figura 4.20.** En este gráfico, se evidencia que solo **3c** (0.5 μM) inhibió la activación de Akt. Además, aunque **3c** a 1.0 μM parecería inhibir Akt, este resultado no fue significativo debido a la alta variabilidad entre experimentos (**Tabla 4.21**).



Figura 4.20. Cambios en la fosforilación de Akt en células C2C12 inducidos por los compuestos **3a**, **3c** y **3f**, durante 48 horas. Se utilizó un anticuerpo anti-p-Akt y un anti-GADPH para asegurar una igual cantidad de proteínas en todos los carriles del gel. Los gráficos de barras representan las cuantificaciones de p-Akt/GADPH. Se muestran *blots* representativos de tres experimentos independientes. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 vs. control.

Tiempo (horas)	48	
Condiciones	Inhibición	p-valor
	(% \pm DE)	(vs. DMSO)
3a 0.5 μΜ	23.0 ± 18.7	0.1645
3c 0.5 μΜ	24.6 ± 9.9	0.0342
3f 0.5 μΜ	6.2 ± 35.8	0.8136
3a 1.0 μM	28.4 ± 49.9	0.4595
3c 1.0 μΜ	54.4 ± 32.9	0.0910
3f 1.0 μΜ	3.5 ± 24.0	0.8403

Tabla 4.21. Porcentaje de inhibición de Akt ejercida por los compuestos **3a**, **3c** y **3f** en células C2C12 a 48 horas de tratamiento. Se muestra el porcentaje ± desvío estándar (DE) y p-valor de la prueba *t-Student* vs. la condición con DMSO (Control).

La línea celular RD presenta altos niveles basales de Akt fosforilada en Ser473, consistente con su estado hiperproliferativo permanente ¹²⁶. Por lo tanto, se evaluó si estos compuestos inhibían efectivamente la actividad de Akt en el modelo de RMS. Las condiciones experimentales fueron las siguientes:

- 1) DMSO
- 2) AC4MOR (3a) 0.5 µM
- 3) AC5DIE (3b) 0.5 µM
- 4) **AC5MOR (3c)** 0.5 μM
- 5) AC6MOR (3f) 0.5 µM
- 6) AC4MOR (3a) 1.0 μM
- 7) AC5DIE (3b) 1.0 µM
- 8) AC5MOR (3c) 1.0 µM
- 9) AC6MOR (3f) 1.0 µM
- 10) LY294002 10 µM

La **Figura 4.22** muestra los cambios en la fosforilación de Akt en células RD tratadas con los compuestos **3a**, **3b**, **3c** y **3f**, durante 24 horas. El inhibidor de referencia de la vía PI3K/Akt, LY294002 (10 μ M), no siempre suprime de manera efectiva la activación de Akt en células cancerosas, incluso a concentraciones como 10 μ M. En ciertos tipos de células, como las resistentes a gemcitabina (PK59),

LY294002 puede incluso aumentar la fosforilación de Akt en lugar de inhibirla, lo que es contrario a lo esperado ¹²⁷. Esto sugiere que la eficacia de LY294002 puede depender del tipo celular y otras variables experimentales, como la resistencia a fármacos. Estos hallazgos son relevantes para comprender la complejidad de la señalización en diferentes contextos tumorales y enfatiza la importancia del desarrollo de nuevos inhibidores.

En contraste a lo que se puede observar para el tratamiento con LY294002, **3b** (0.5 μ M) y **3f** (1.0 μ M) inhibieron la fosforilación de Akt en células RD en un 56.8% y 86.1%, respectivamente (**Tabla 4.23**). Además, **3f** (0.5 μ M) actuó como un inhibidor eficiente, de manera similar a **3a** (0.5 μ M). Mientras que **3c** (0.5 μ M) y **3b** (1.0 μ M) parecieron inhibir la fosforilación de Akt sin embargo, las variaciones entre experimentos impidieron que los datos fueran significativos (**Tabla 4.23**).



Figura 4.22. Efecto de los compuestos **3a**, **3b**, **3c** y **3f** sobre la fosforilación de Akt en células RD luego de 24 horas de tratamiento. Se utilizó un anticuerpo anti-p-Akt y un anti-GADPH se empleó para asegurar una carga proteica equivalente en todos los carriles de los geles. Los gráficos de barras representan las cuantificaciones de p-Akt/GADPH. Se muestran *blots* representativos de tres experimentos independientes. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 vs. control.

Tiempo (horas)	24	
Condicionos	Inhibición	p-valor
Condiciones	(% ± DE)	(vs. DMSO)
3a 0.5 μΜ	40.3 ± 9.3	0.0017
3b 0.5 μΜ	56.8 ± 3.5	1.05E-5
3c 0.5 μΜ	46.2±51.9	0.1977
3f 0.5 μΜ	33.2 ± 10.2	0.0048
3a 1.0 μM	-21.9 ± 17.6	0.0980
3b 1.0 μΜ	51.3 ± 48.7	0.1417
3c 1.0 μM	-37.0 ± 35.4	0.1444
3f 1.0 μΜ	86.1 ± 13.0	0.0003
LY294002 10 µM	17.9±27.0	0.3154

Tabla 4.23. Porcentaje de disminución de la fosforilación de Akt inducida por los compuestos **3a, 3b**, **3c** y **3f** durante 24 horas en células RD. Se muestran el porcentaje ± desviación estándar (DE) y el p-valor obtenido mediante la prueba t -*Student* en comparación con la condición de DMSO (Control).

De igual manera, se evaluaron los cambios en la fosforilación de Akt en células RD inducidos por los derivados de 1,3-DHA mencionados durante 48 horas. La **Figura 4.24** muestra que **3a** y **3c** (0.5 μ M) fueron inhibidores efectivos de la activación de Akt. Es relevante reconocer que todos los compuestos probados a 1.0 μ M durante 48 horas fueron altamente exitosos en inhibir la fosforilación de Akt (**Figura 4.24** y **Tabla 4.25**). De manera similar, LY294002 (10 μ M) también inhibió la fosforilación de Akt a las 48 horas de tratamiento. Cabe destacar que en las células RD, el estado de fosforilación de Akt en presencia de LY294002 depende tanto del estado metabólico como del estado oxigénico de las células ¹²⁸.



Figura 4.24. Efecto de los compuestos **3a**, **3b**, **3c** y **3f** sobre la fosforilación de Akt en células RD luego de 48 horas de tratamiento. Se utilizó un anticuerpo anti-p-Akt y un anti-GADPH se empleó para asegurar una carga proteica equivalente en todos los carriles de los geles. Los gráficos de barras representan las cuantificaciones de p-Akt/GADPH. Se muestran *blots* representativos de tres experimentos independientes. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 vs. control.

Tiempo (horas)	48	
Condiciones	Inhibición	p-valor
Condiciones	(% ± DE)	(vs. DMSO)
3a 0.5 μΜ	76.4 ± 15.6	0.0063
3b 0.5 μΜ	28.4 ± 10.5	0.0782
3c 0.5 μΜ	48.1 ± 5.1	0.0295
3f 0.5 μΜ	28.8 ± 8.5	0.0624
3a 1.0 μΜ	87.8 ± 7.7	0.0013
3b 1.0 μΜ	80.5 ± 1.7	0.0072
3c 1.0 μΜ	57.8 ± 11.0	0.0093
3f 1.0 μΜ	64.8 ± 3.4	0.0132
LY294002 10 μM	76.8 ± 8.4	0.0082

Tabla 4.25. Porcentaje de disminución de la fosforilación de Akt inducida por los compuestos 3a, 3b,
3c y 3f durante 48 horas en células RD. Se muestran el porcentaje ± desviación estándar (DE) y el valor de p obtenido mediante la prueba t -*Student* en comparación con la condición de DMSO (Control).

En resumen, los resultados hasta aquí mostrados indican que estos nuevos derivados de 1,3-DHA (**3a**, **3b**, **3c** y **3f**) son inhibidores prometedores de Akt en células cancerosas, considerando el tiempo de exposición y las dosis exploradas. Por lo tanto, estos químicos podrían servir como punto de partida en la búsqueda ambiciosa de nuevos agentes antineoplásicos.
4.3 Resultados del modelado molecular

4.3.1 PDK1 como objetivo molecular

La quinasa dependiente de 3-fosfoinosítido-1 (PDK1), una serina/treonina quinasa de 63 kDa, es un regulador clave en la vía de señalización de fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K). PDK1 fosforila residuos de serina o treonina altamente conservados en el bucle de activación (o T-loop) de al menos 23 quinasas relacionadas de la familia AGC, incluyendo Akt, p70S6K, RSK, SGK y PKC¹²⁹. Debido a esto, se denomina a PDK1 la "quinasa maestra", ya que casi todas las respuestas celulares a nivel de PI3K son mediadas por quinasas AGC, siendo PDK1 el activador común en respuesta al segundo mensajero inducido por PI3K, fosfatidilinositol 3,4,5-trisfosfato (PIP₃)¹²⁹. Debido a que la nueva serie de derivados de 1,3-DHA inhibe eficazmente la activación de Akt y este evento es promovido en nuestro sistema experimental por la activación previa de la vía PI3K, se investigó computacionalmente la posible unión de estos nuevos ligandos a PDK1. Esta investigación se motivó por la similitud estructural entre el andamio de acridona y el inhibidor derivado de antrona PS653 (**Figura 4.26**), que se une reversiblemente al sitio de unión de ATP en PDK1¹³⁰.



Figura 4.26. Estructura de PS653.

La **Figura 4.27 B** muestra la estructura química de **3b** junto con PS653, donde los esqueletos de acridona y antrona están destacados en azul. De manera similar a la porción de adenina del ATP, el PS653 forma dos enlaces de hidrógeno con los átomos de la cadena principal de Ser160 (oxígeno) y Ala162 (nitrógeno)⁹⁸, que pertenecen a la denominada región de enlace. La molécula de PDK1 completa contiene 556 residuos de aminoácidos que comprenden el dominio de quinasa serina-treonina N-terminal y un dominio de homología pleckstrina (PH) C-terminal. La **Figura 4.27 A** muestra el dominio de quinasa de PDK1, que está formado por dos lóbulos con el sitio de unión de ATP ubicado en la hendidura entre ambos. La **Figura 4.27 C** compara el modo de unión de ATP y PS653 a PDK1, evidenciando que el inhibidor derivado de antrona se une en la misma posición que la porción de adenina del ATP. La **Figura 4.27 D** combina el motivo de unión de ATP con el modo de unión de **3b** predicho por simulaciones de acoplamiento. De manera similar al andamio de antrona, la porción de

adenina del ATP está ocupada por el esqueleto de acridona, mientras que la cadena alifática seguida del grupo amino se extiende hacia la región de unión del trifosfato.



Figura 4.27. Estructura tridimensional de PDK1 y el motivo de unión de sus ligandos: **A)** Estructura cristalina tridimensional del dominio quinasa de PDK1 humano en complejo con su ligando natural, ATP (código PDB: 1H1W). El dominio quinasa se subdivide en dos lóbulos, donde el lóbulo C-terminal, representado con cintas y coloreado en violeta, es mucho más grande que el lóbulo N-terminal, coloreado en gris. Entre ambos lóbulos se encuentra el sitio de unión de ATP, cuyo techo está formado por el bucle rico en glicina (*Gly-rich-loop*). La molécula de ATP se muestra con palitos, donde los átomos de oxígeno están coloreados en rojo, los de nitrógeno en azul oscuro, los de carbono en cian y los de fósforo en amarillo. **B)** Estructura química del compuesto **3b** y del PS653. **C)** y **D)** Comparación entre la conformación de ATP/PS653 y ATP/**3b** en el sitio de unión de PDK1, respectivamente. En ambos casos, las moléculas se representan con palitos y siguiendo el mismo código de color utilizado anteriormente, excepto por los átomos de carbono en el ATP, que están coloreados en marrón claro.

La **Tabla 4.28** compila los resultados de puntuación de acoplamiento para la nueva serie de derivados de 1,3-DHA junto con el inhibidor de referencia PS653. Para todos estos nuevos derivados, que incluyen compuestos con un *linker* o espaciador de 3 a 6 metilenos y morfolina o dietilamina como grupo amino, se observan valores de puntuación de acoplamiento en el mismo rango que el de PS653 (todas las energías libres de unión predichas difieren en menos de 1 kcal/mol). Este resultado alentador nos llevó a explorar la estabilidad estructural del complejo con el ligando, así como a determinar la energía libre absoluta de unión del ligando mediante métodos más rigurosos.

ID Ligando	Docking score
AC3MOR	-7.51
AC3DIE	-7.21
AC4DIE	-7.28
AC4MOR (3a)	-8.38
AC5DIE (3b)	-7.63
AC5MOR (3c)	-8.50
AC6MOR (3f)	-8.47
AC6DIE	-7.67
PS653	-7.70



 $\begin{array}{l} \textbf{AC3DIE} = n: 3; -NR_2: dietilamina\\ \textbf{AC3MOR} = n: 3; -NR_2: morfolina\\ \textbf{AC4DIE} = n: 4; -NR_2: dietilamina\\ \textbf{AC4MOR} = n: 4; -NR_2: morfolina\\ \textbf{AC5DIE} = n: 5; -NR_2: dietilamina\\ \textbf{AC5MOR} = n: 5; -NR_2: morfolina\\ \textbf{AC6DIE} = n: 6; -NR_2: dietilamina\\ \textbf{AC6MOR} = n: 6; -NR_2: morfolina\\ \end{array}$

Tabla 4.28. Simulaciones de acoplamiento molecular: en todos los casos, los valores reportadoscorresponden con el resultado de puntuación de acoplamiento más alto.

4.3.2 Simulaciones de dinámica molecular de PDK1-PS653 y PDK1-3b: Estabilidad estructural del complejo y cálculos absolutos de energía de unión.

Tras los cálculos de acoplamiento, las estructuras con menor energía fueron refinadas mediante simulaciones de dinámica molecular. La **Tabla 4.29** compila el número de réplicas y el tiempo de simulación por réplica para cada sistema.

ID Ligando	Réplicas	Tiempo por réplica (ns)
AC3MOR	1	500
AC4MOR (3a)	1	500
AC5MOR (3c)	1	500
AC6MOR (3f)	1	500
AC3DIE	1	500
AC4DIE	1	500
AC5DIE (3b)	3	1000
AC6DIE	1	500
PS653	3	1000

Tabla 4.29. Resumen de simulaciones de dinámica molecular: número de réplicas por sistema y tiempo de simulación por réplica expresado en nanosegundos (ns).

En principio, nos centramos en el derivado **3b** (**AC5DIE**), ya que como vimos previamente, este compuesto inhibe eficazmente la fosforilación de Akt en las líneas celulares C2C12 y RD. Por lo tanto, se compara el comportamiento de **3b** con el inhibidor de referencia PS653.

En un trabajo reciente ¹³¹, el grupo dirigido por Xavier Barril postuló que las interacciones de enlaces de hidrógeno pueden ser uno de los principales determinantes de la estabilidad estructural en complejos no covalentes y estableció una relación clara entre la resiliencia de los enlaces de hidrógeno intermoleculares, medida como el trabajo necesario para interrumpir el estado ideal del enlace de hidrógeno y alcanzar un estado cuasi-enlazado (denominado WQB ¹³¹), con el potencial de unión de los ligandos. Por lo tanto, mostraron que los compuestos activos son estructuralmente estables y presentan valores de WQB más altos que los inactivos. Finalmente, de ese estudio surgió un valor de WQB de 6 kcal/mol como umbral para los fuertes ligandos (IC50 < 1.0μ M)¹³¹.

La **Figura 4.30 A** muestra el perfil de trabajo, obtenido de simulaciones SMD, en función de la distancia entre átomos pesados, donde el enlace de hidrógeno intermolecular clave se estira desde una

distancia inicial de 2,5 Å (contacto cercano) hasta 5,0 Å (contacto roto). El estado cuasi-enlazado (QB) se define como el punto con la energía más alta en relación con la geometría ideal del enlace de hidrógeno¹³¹ y el valor registrado corresponde en ambos casos al valor más bajo de 25 réplicas independientes. En todos los casos, la interacción de anclaje o clave (posteriormente sujeta a simulación SMD) se seleccionó a partir de cortas ejecuciones de equilibrio MD no sesgadas en las que se determinaron las interacciones más prevalentes de enlace de hidrógeno convencional aplicando criterios geométricos (distancia entre átomos pesados menor de 3,5 Å y el ángulo donador-hidrógenoaceptor mayor de 160°). De la Figura 4.30 A (arriba), se puede ver que la interacción de enlace de hidrógeno entre el pequeño ligando PS653 y Ser160 presenta una fuerte oposición a pequeñas distorsiones estructurales con un valor de WQB de 14,5 kcal/mol. Además, la interacción de enlace de hidrógeno entre 2 y Ala162, Figura 4.30 A (abajo), también da lugar a un mínimo local en el paisaje de energía libre con un valor de WQB de 8,2 kcal/mol. En resumen, hemos aplicado simulaciones SMD para estimar el perfil de trabajo asociado con la perturbación de las interacciones clave de enlace de hidrógeno ligando-proteína en un intento de caracterizar la estabilidad estructural del complejo no covalente como se definió anteriormente ¹³¹. En este punto, es importante destacar la naturaleza ortogonal de este método respecto a los esfuerzos basados en la termodinámica, como las simulaciones de acoplamiento. Para ambos ligandos explorados aquí, observamos una alta resiliencia de los enlaces de hidrógeno intermoleculares a la interrupción y, por lo tanto, se podría esperar no solo una alta afinidad de unión (puntuación de acoplamiento), sino también complejos estructuralmente estables. Una nota final es que en este caso no fue necesario reducir el receptor como se implementa en el protocolo de Duck¹³¹, ya que se quiere comparar el rendimiento y la estabilidad estructural de una pequeña serie de ligandos y no está incorporado como parte de una campaña de cribado virtual masiva.



Figura 4.30. Estabilidad estructural del complejo ligando-proteína y cálculos de energía libre de unión: **A)** Perfiles de trabajo obtenidos a partir de simulaciones SMD donde un enlace de hidrógeno intermolecular clave se estira desde una distancia inicial de 2,5 Å (contacto cercano) hasta 5,0 Å (contacto roto). El estado cuasi-enlazado (QB) se define como el punto con la mayor energía relativa a la geometría ideal del enlace de hidrógeno ¹³². **B)** Número de interacciones de enlace de hidrógeno entre proteína y ligando en función del tiempo de simulación (se muestra una sola réplica por complejo para simplificar, ya que se observa el mismo comportamiento en las tres réplicas). En todos los casos, una interacción dada se forma basándose en criterios geométricos: distancia entre átomos pesados menor de 3,5 Å y ángulo donador-hidrógeno-aceptor mayor de 140°. **C)** Análisis de descomposición de energía libre por residuo para el complejo PDK1-PS653 (arriba) y el complejo PDK1-**3b** (abajo). **D)** Interacciones de enlace de hidrógeno para PS653 y **3b** en el sitio de unión de PDK1: en ambos casos, los enlaces no covalentes se muestran como varillas verdes.

A continuación, realizamos simulaciones exhaustivas de dinámica molecular no sesgadas (tiempo de simulación acumulado de 3000 nanosegundos) con el fin de caracterizar la dinámica del complejo y estimar la energía libre de unión del ligando. La **Figura 4.30 B** muestra el número total de interacciones de enlace de hidrógeno intermoleculares entre el ligando y la proteína en función del tiempo de simulación. Observamos que PS653 es capaz de formar simultáneamente dos interacciones en el sitio de unión de PDK1, mientras que el complejo **3b**-PDK1 exhibe tres interacciones intermoleculares en la mayoría de las configuraciones. La **Tabla 4.31** compila la fracción de tiempo durante la cual se forma

como la distancia promedio entre los átomos pesados donadores y aceptores. Por lo tanto, PS653 establece enlaces de hidrógeno altamente estables con los residuos Ser160 (se forma el 99% del tiempo de simulación) y Ala162 (presente el 76% del tiempo de simulación). En el caso de **3b**, las interacciones más prevalentes se establecieron con Glu166, Ala162 y Asp223. La **Figura 4.30 D** muestra las interacciones de enlace de hidrógeno para PS653 y **3b** en el sitio de unión de PDK1 (los enlaces no covalentes se muestran como varillas verdes).

Ligando	Residuo	Fracción	Distancia promedio (Å)
AC5DIE (3b)	Glu166	0.92	2.80
AC5DIE (3b)	Ala162	0.83	3.04
AC5DIE (3b)	Asp223	0.57	2.74
PS653	Ser160	0.99	2.82
PS653	Ala162	0.76	3.11

Tabla 4.31. Interacciones de enlace de hidrógeno entre el ligando y la proteína: en todos los casos, se reporta la fracción de tiempo durante la cual se forma una interacción dada, basada en criterios geométricos: distancia entre átomos pesados menor de 3,5 Å y ángulo donador-hidrógeno-aceptor mayor de 160°. La distancia promedio se estimó a partir de la fracción de configuraciones en las que está presente la interacción dada. En ambos casos, se consideraron un total de 24000 configuraciones de los últimos 800 nanosegundos de cada réplica.

La energía libre de unión de un complejo molecular es una medida rigurosa de la termodinámica que refleja el grado de afinidad mutua entre dos moléculas. Para evaluar cuantitativamente la eficiencia de los nuevos posibles inhibidores de PDK1, hemos estimado y comparado la energía libre de unión absoluta para PS653 y **3b** mediante tres métodos diferentes: MM-GBSA, energía de interacción lineal como propone Miranda *et al.*¹³³ e integración termodinámica (TI). El enfoque MM-GBSA, basado en simulaciones de dinámica molecular, ha sido ampliamente utilizado para predecir energías libres de unión, siendo más eficiente computacionalmente que métodos rigurosos como la integración termodinámica. La **Figura 4.30 C** presenta la descomposición de la energía libre por residuo para el complejo PDK1-PS653 (arriba) y el complejo PDK1-**3b** (abajo) obtenida mediante cálculos MM-GBSA. De este análisis se desprende que ambos ligandos comparten la misma región de unión y establecen

interacciones con las cadenas laterales de Leu88, Val96, Tyr161 y Leu212. Además, ambas moléculas presentan una interacción de enlace de hidrógeno con Ala162 perteneciente a la llamada región de enlace. A diferencia del inhibidor PS653, **3b** establece dos interacciones de puente salino altamente estables con las cadenas laterales de Glu166 y Asp223 (véase **Figura 4.30 C**). De hecho, estos pares de contactos intermoleculares, que ocurren mediante átomos de nitrógeno del esqueleto de acridona y el grupo amino terminal, representan la mayor contribución de energía libre al evento de unión del ligando.

La **Tabla 4.32** recopila los valores de la energía libre de unión absoluta para la formación de los complejos PS653-PDK1 y **3b**-PDK1. En ambos casos, los valores promedio de la energía libre y sus desviaciones estándar se estimaron a partir de tres réplicas independientes. Por lo tanto, a partir de las simulaciones MM-GBSA, se espera una mayor afinidad para **3b** en comparación con PS653.

Ligando	MM-GBSA	LIE-D	ТІ
ΔG	-32.3 ± 0.4	-6.57	-7.4 ± 0.7
ΔG	-53.2 ± 3.6	-12.12	-15.5 ± 0.8

Tabla 4.32. Cálculos de la energía libre de unión absoluta: una comparación entre PS653 y **3b**. En todos los casos, los valores reportados de energía libre se expresan en kcal/mol. En el caso de TI y MM-GBSA, los valores promedio de energía libre y la desviación estándar se estimaron a partir de tres réplicas independientes.

Además, la **Tabla 4.33** recopila los resultados de energía libre para la nueva serie extendida de derivados de 1,3-DHA obtenidos mediante el método MM-GBSA y LIE-D. Se observa una concordancia cercana en los valores de energía libre obtenidos para toda la serie, incluso cuando se consideró un menor número de réplicas y tiempo de simulación. Teniendo en cuenta que la desviación cuadrática media, RMSD, para los átomos pesados de los ligandos fue menor de 5 Å (ligandos con solo una posición de unión), una simulación de dinámica molecular más prolongada puede no ser necesaria para lograr mejores predicciones, ya que solo se están estimando las energías de unión.

ID Ligando	MM-GBSA (kcal/mol)	LIE-D
AC3DIE	-46.2 ± 6.1	-11.43
AC3MOR	-51.1 ± 5.1	-11.22
AC4DIE	-47.2 ± 4.6	-12.04
AC4MOR (3a)	-47.6 ± 5.1	-11.58
AC5MOR (3c)	-46.4 ± 4.2	-10.86
AC6MOR (3f)	-54.0 ± 6.0	-12.67
AC6DIE	-51.39 ± 4.6	-11.81

Tabla 4.33. Cálculos de la energía libre de unión absoluta para la serie extendida de nuevos derivadosaplicando el método MM-GBSA y LIE-D.

Además, la **Figura 4.34 (A-D)** muestra el análisis de descomposición de la energía libre por residuo para los derivados de 1,3-DHA con longitudes de espaciador de 3 a 6 grupos metileno y dietilamina como grupo amino terminal (denominados **AC3DIE (Figura 4.34, A), AC4DIE (Figura 4.34, B), AC5DIE (3b) (Figura 4.34, C)** y **AC6DIE (Figura 4.34, D)** respectivamente). A partir de estos datos, se hace evidente que todos estos derivados, excepto **AC3DIE**, establecen dos interacciones de puente salino altamente estables con las cadenas laterales de Glu166 y Asp223. En el caso de **AC3DIE**, el puente salino con la cadena lateral de Asp223 se reemplaza por una interacción equivalente con Glu209, presumiblemente debido a la menor longitud del espaciador. Este resultado también es evidente en la **Tabla 4.35**, que recopila la fracción de tiempo en que se forma una interacción de enlace de hidrógeno dada, basada en criterios geométricos para los derivados **AC3DIE**, **AC4DIE**, **AC5DIE (3b)** y **AC6DIE**. Todos los derivados muestran las mismas interacciones intermoleculares con Ala162 y Glu166, realizadas por los átomos del esqueleto de acridona. En todos los casos, se observaron resultados similares para la serie de derivados que incluyen morfolina como grupo amino terminal (denominados **AC3MOR, AC4MOR (3a), AC5MOR (3c) y AC6MOR (3f)**).



Figura 4.34. Contribución por residuo a la energía libre de unión estimada mediante el método MM-GBSA, para los derivados **A) AC3DIE, B) AC4DIE, C) AC5DIE** (**3b**) y **D) AC6DIE**.

Ligando	Residuo	Fracción	Distancia promedio
	Glu166	0.81	2.80
AC3DIE	Ala162	0.69	3.09
	Glu209	0.43	2.75
	Glu166	0.62	2.85
AC4DIE	Ala162	0.81	3.06
	Asp223	0.83	2.75
	Glu166	0.92	2.80
AC5DIE (3b)	Ala162	0.83	3.04
	Asp223	0.57	2.74
	Glu166	0.81	2.80
AC6DIE	Ala162	0.83	3.05
	Asp223	0.93	2.72

Tabla 4.35. Interacciones de enlace de hidrógeno (*H-bond*) entre ligando y proteína: en todos los casos, se informa la fracción de tiempo en que se forma una interacción dada, basada en criterios geométricos: distancia entre átomos pesados menor de 3,5 Å y ángulo donante-hidrógeno-aceptor mayor de 160°. La distancia promedio se estimó a partir de la fracción de configuraciones en las que está presente la interacción dada. Para **AC3DIE**, **AC4DIE** y **AC6DIE** se tomaron en cuenta un total de 3000 configuraciones de los últimos 300 nanosegundos de la simulación de dinámica molecular no sesgada. Para **AC5DIE (3b)**, se consideraron un total de 24000 configuraciones de los últimos 800 nanosegundos de cada réplica.

Además, la energía libre de unión absoluta para PS653, predicha aquí por el método más riguroso TI, está en estrecha concordancia con los resultados experimentales ¹³⁰. Una vez más, se espera una

mayor inhibición de PDK1 por parte de **3b** en comparación con PS653, según los cálculos de TI. Además, los tres métodos aplicados aquí, MM-GBSA, LIE-D y TI, señalan la misma tendencia y revelan que la formación del complejo **3b**-PDK1 puede ser termodinámicamente favorable. En resumen, estos datos apoyan la inhibición de PDK1 por el nuevo ligando **3b** (y sus congéneres) y ayudan a racionalizar el resultado experimental expuesto anteriormente.

Finalmente, es importante mencionar que sería deseable en un trabajo futuro evaluar estos esfuerzos computacionales con un ensayo enzimático de PDK1 para validar experimentalmente el objetivo molecular propuesto aquí con apoyo *in-silico*. Además, con el propósito de evaluar el mecanismo de unión de los ligandos, sería necesario resolver la estructura tridimensional respectiva del complejo.

4.3.3 Análisis de la dinámica de PDK1: Matriz de correlación cruzada dinámica y análisis de componentes principales.

El alosterismo es un mecanismo fundamental de comunicación intramolecular en las proteínas, donde una perturbación local afecta la estructura y la dinámica en regiones distales. El alosterismo ha sido una estrategia crucial para el desarrollo de inhibidores de quinasas que no compiten con el ATP. En el pequeño lóbulo N de PDK1, una cavidad hidrofóbica de 5 Å de profundidad, llamada bolsillo PIF, regula la unión de ATP a la proteína, su actividad y su interacción con sustratos¹³⁰. Por lo tanto, el bolsillo PIF, que está alejado del sitio de unión del ATP, puede actuar como un sitio alostérico bien conocido de PDK1. Como resultado, la búsqueda de activadores o inhibidores alostéricos, es decir, moléculas dirigidas al bolsillo PIF que afectan el sitio ortostérico de unión al ATP ("ortostérico" se refiere al sitio principal donde el ATP se une directamente a la proteína, en contraste con sitios alostéricos que modulan la actividad de la proteína a través de interacciones en lugares distintos), ha atraído gran interés durante varios años. Más recientemente, el grupo de investigación liderado por Ricardo Biondi exploró la regulación alostérica "inversa" de PDK1: pequeñas moléculas que se unen al sitio de unión de ATP y afectan al sitio alostérico regulador del bolsillo PIF¹³⁰. En este sentido, PS653 se une al sitio de unión de ATP y produce efectos alostéricos en el bolsillo PIF, inhibiendo la unión en esa región distal¹³⁰. Por lo tanto, con el propósito de detectar la posible ocurrencia de este efecto alostérico debido a la presencia de 3b, se ha caracterizado la dinámica de PDK1 mediante el análisis de componentes principales (PCA) y calculando la matriz de correlación cruzada dinámica (DCCM). El análisis de componentes principales (PCA) se utilizó para identificar los movimientos dominantes de la proteína PDK1 y relacionarlos con la presencia de los ligandos ¹³⁴. Las correlaciones entre los dominios en la proteína PDK1 se determinaron calculando la DCCM^{134,135}.

La **Figura 4.36 A** muestra la red de correlación cruzada dinámica para los átomos de carbono a en presencia de **3b** (izquierda) y PS653 (derecha). El mapa DCCM para el complejo PDK1-**3b** exhibe los dos lóbulos del dominio catalítico de PDK1 claramente definidos, con un alto número de correlaciones positivas entre los residuos pertenecientes al mismo lóbulo N pequeño (residuos 70 a 155) o al lóbulo C más grande (residuos 160 a 350). En contraste, para el complejo PDK1-PS653, las correlaciones positivas intra-lóbulo se reducen respecto al comportamiento inducido por **3b**, siendo el lóbulo C más grande, la región más afectada (colores más claros son evidentes entre los residuos 160 y 350, lo que indica un menor número de movimientos correlativos). Este resultado está de acuerdo con estudios experimentales y computacionales previos que señalaron que PS653 previene el cierre completo de los dos lóbulos y rompe la espina catalítica ^{130,136}. Por otro lado, se observó una reducción general en las correlaciones positivas entre lóbulos para ambos sistemas, mientras que el complejo PDK1-**3b** exhibió una clara banda de anti-correlaciones entre el lóbulo N y el lóbulo C.



Figura 4.36. PCA y DCCM en presencia de ligandos. **A)** Red de correlación cruzada dinámica para los carbonos a en presencia de **3b** y PS653. **B)** Las distancias de los Ca se han proyectado sobre los primeros y terceros componentes principales (PC1 y PC3). La probabilidad de la muestra describe la fracción del tiempo de simulación que se pasa en un estado particular en el espacio de PC. **C)** Representación esquemática del movimiento de rotación (giro) y bisagra de PDK1 como se definió previamente ¹³⁰. **D)** Distribución de probabilidad para el movimiento de bisagra de PDK1, descrita previamente mediante la distancia entre el lazo rico en glicina y el residuo Asp205 ¹³⁰: **3b** (verde) y PS653 (rojo).

La Figura 4.36 B muestra las proyecciones del conjunto sobre los primeros y terceros componentes principales (PC1 y PC3) en presencia de 3b (izquierda) y PS653 (derecha). Como se señaló previamente, PS653 induce un claro incremento en el movimiento rotacional de PDK1 ¹³⁰. La representación del movimiento de los primeros y terceros modos del análisis PCA, como se muestra en la Figura 4.37, señala la rotación simultánea del lóbulo N con respecto al lóbulo C (movimiento de torsión-PC3) y la apertura del sitio de unión de ATP (PC1), previamente nombrado como movimiento de bisagra ¹³⁰. La Figura 4.36 C muestra una representación esquemática de los mencionados movimientos de bisagra y torsión de PDK1. A diferencia de PS653, 3b reduce el movimiento de rotación, como se evidencia en los valores más cercanos a cero para PC3 (ver Figura 4.36 B). Desde el PC1, se evidencia la existencia de un único mínimo para PS653 ubicado en valores positivos, lo que implica en gran medida una conformación abierta para el sitio catalítico (Figura 4.36 B y Figura 4.37). En contraste, se observa una distribución más amplia para **3b**, con el mínimo más profundo ubicado en valores negativos de PC1. Además, la Figura 4.36 D muestra la distribución de probabilidad para el movimiento de bisagra de PDK1, estimada mediante la distancia entre el lazo rico en glicina y el residuo Asp205, como lo realizó Biondi et al. ¹³⁰. A diferencia de PS653, 3b favorece en gran medida una conformación cerrada (distancias centradas en 15 Å) y, por lo tanto, suprime el movimiento de bisagra. Este cambio conformacional inducido por la presencia de 3b podría entenderse teniendo en cuenta las interacciones intermoleculares ligando-proteína discutidas anteriormente. El compuesto 3b (y sus congéneres), a través de su esqueleto de acridona, es capaz de formar enlaces de hidrógeno y puentes salinos altamente estables con Ala162, perteneciente a la región de enlace, y Glu166 del lóbulo C. Estas interacciones intermoleculares podrían llevar a que el lóbulo N y el lóbulo C se cierren más, como se observó anteriormente para la molécula de adenosina ¹³⁰. A diferencia de PS653, el cierre del sitio de unión de ATP inducido por la presencia de **3b** podría ayudar a optimizar el acoplamiento alostérico entre los dos lóbulos y, presumiblemente, aumentar la unión en el bolsillo PIF.



Figura 4.37. Análisis de componentes principales. **A)** Representación del movimiento de los modos primero y tercero del PCA de los carbonos α de PDK1, que describen el movimiento de bisagra y la rotación del lóbulo N con respecto al lóbulo C (giro), respectivamente. **B)** Representación esquemática del movimiento de bisagra y giro: configuraciones que pertenecen a los valores extremos positivos y negativos en el análisis PCA, respectivamente. **C)** Contribución por residuo a PC1 (arriba) y PC3 (abajo).

En resumen, nuestras simulaciones expusieron dinámicas diferenciales para el dominio catalítico de PDK1 ajustadas por la presencia de los ligandos, donde efectos alostéricos opuestos pueden ser inducidos en el sitio regulador bolsillo PIF por PS653 y **3b**. Finalmente, sería de suma importancia corroborar experimentalmente estos resultados en un futuro trabajo.

4.4 Derivado de Xantona

Las **xantonas**, dibenzo-γ-pironas, han suscitado un interés significativo debido a sus diversas actividades biológicas, que incluyen propiedades antioxidantes y anticancerígenas, así como también inhibición de α-glucosidasa, y efectos antibacterianos y antifúngicos ^{27,132,137}. Aprovechando la amplia experiencia del grupo de investigación SINTOM del cual formo parte, en la síntesis de estructuras tricíclicas fusionadas ^{137,138}, como se explicó en forma detallada anteriormente se identificó el compuesto **AC5DIE**, 3-((5-(dietilamino)pentil)oxi)-1-hidroxiacridin-9(10*H*)-ona **(3b)** como un potente inhibidor de la activación de Akt en una línea celular de mioblastos inmortalizados, superando la eficacia del inhibidor comercialmente disponible LY294002. Sin embargo, en la línea celular de RMS

(RD), aunque el compuesto fue más efectivo como inhibidor de Akt, en algunos casos la variabilidad entre experimentos no permitió observar un efecto final del todo concluyente.

Motivados por estos hallazgos, se dirigió la atención al análogo oxigenado del compuesto **3b**, denominado 3-((5-(dietilamino)pentil)oxi)-1-hidroxi-9*H*-xanten-9-ona, denominado **XA5DIE (6)**. Su síntesis se detalla en el apartado **3.1.2**, con su correspondiente caracterización espectroscópica (Ver **Anexo, Figura 25** y **Figura 26**). Con una identificación previa de las propiedades estructurales y farmacológicas de **6** como un potencial fármaco contra el Alzheimer ¹³⁷, se propuso explorar su potencial anticancerígeno, en particular su actividad biológica en células de RMS, y también examinando sus efectos en mioblastos inmortalizados.

4.4.1 Efecto de XA5DIE sobre la viabilidad de células de RMS y C2C12

Se evaluaron los efectos del análogo de xantona **6** sobre la viabilidad celular en las líneas C2C12 y RD (**Figura 4.38, A y B**, respectivamente), de igual manera a como se realizó para **3b**. Los tratamientos para evaluar la viabilidad celular fueron llevados a cabo durante 24 y 48 horas. Las condiciones experimentales fueron:

1) DMSO



2) XA5DIE (6) 1.0 µM

Figura 4.38. Efecto del compuesto **XA5DIE** a 1.0 μ M durante 24 y 48 horas sobre la viabilidad celular de las líneas celulares **(A)** C2C12 y **(B)** RD. Las células se cultivaron en medio de crecimiento hasta el 70% de confluencia y se privaron de suero durante 24 horas para sincronizarlas. Luego, se incubaron durante 24 y 48 horas con DMSO (<0.1%, control) y **XA5DIE** o **6** (1.0 μ M). Se cuantificaron las células muertas (teñidas con el colorante azul de tripán) y las células vivas (que excluyeron el colorante) utilizando una cámara de Neubauer. El gráfico de barras muestra los resultados cuantitativos del

número de células vivas de tres experimentos independientes. Los resultados representan la media + desviación estándar de 3 experimentos independientes. *p<0.05 vs. control.

A partir de la **Figura 4.38**, se puede determinar que el tratamiento con el compuesto **XA5DIE (6)** no provocó efectos significativos sobre la viabilidad de las células musculares esqueléticas normales. Por el contrario, en la línea celular tumoral, el tratamiento con este compuesto a una concentración de 1.0 µM condujo a una disminución significativa en el número de células viables en ambos tiempos evaluados. Con respecto al número de células muertas, representaron menos del 1% y no se observaron diferencias significativas, razón por la cual no se muestran en la figura. Se recuerda que el análogo nitrogenado de **XA5DIE**, llamado compuesto **AC5DIE** o **3b**, no produjo cambios en la viabilidad celular en ninguna de las líneas celulares testeadas cuando fue evaluado en la misma concentración y tiempos que **XA5DIE (6).**

4.4.2 Cambios en la densidad celular, el metabolismo mitocondrial y el estado de los núcleos evaluados con Tinción de *MitoTracker* y DAPI

Se compararon los efectos del compuesto **XA5DIE (6)** con su análogo nitrogenado **AC5DIE (3b)** sobre el número celular y la distribución de la red mitocondrial, para lo cual se emplearon las siguientes condiciones experimentales:

- 1) DMSO
- 2) AC5DIE (3b) 0.5 µM
- 3) AC5DIE (3b) 1.0 µM
- 4) **XA5DIE (6)** 0.5 μM
- 5) XA5DIE (6) 1.0 µM

Los resultados obtenidos son consistentes con los obtenidos en los ensayos de viabilidad (**Figura 4.38**). En la línea celular C2C12 (**Figura 4.39 A**), tanto el tratamiento con el compuesto **XA5DIE** como el uso de su análogo nitrogenado **AC5DIE**, demostró que ninguno de ellos indujo cambios en el número de células (densidad celular) en comparación con la condición control con DMSO.

Por el contrario, en la línea celular RD (**Figura 4.39 B**), el tratamiento con **XA5DIE** provocó una disminución en la cantidad de células en ambos tiempos y concentraciones evaluadas. Mientras que con el compuesto **AC5DIE**, no se observaron cambios en la densidad celular en comparación con el control con DMSO.



Figura 4.39. Ensayo realizado utilizando la tinción con *MitoTracker* (rojo) y DAPI (azul) para mitocondrias y núcleos, respectivamente, tras el tratamiento con los compuestos **XA5DIE** y **AC5DIE** en las líneas celulares **(A)** C2C12 y **(B)** RD. Las imágenes tomadas con 40X ilustran un área representativa del tratamiento evaluado.

La distribución de la red mitocondrial no resultó alterada por ninguno de los tratamientos. Tampoco se observan cambios en la morfología nuclear.

4.4.3 Cambios en la activación de Akt inducidos por XA5DIE en células de RMS y C2C12

Se evaluaron los cambios en la fosforilación de Akt inducidos por **XA5DIE** a 24 y 48 horas en la línea celular C2C12 (**Figura 4.40, A** y **B**) y RD (**Figura 4.41, A** y **B**). Las condiciones experimentales fueron las siguientes:

1) DMSO

- 2) XA5DIE (6) 0.5 µM
- 3) XA5DIE (6) 1.0 µM
- 4) LY294002 10 µM



Figura 4.40. Cambios en la fosforilación de Akt desencadenados por el tratamiento con **XA5DIE** en la línea celular C2C12 al cabo de **(A)** 24 y **(B)** 48 horas. El *Western blot* se realizó utilizando un anticuerpo anti-p-Akt. Se empleó un anti-GAPDH para asegurar una carga de proteína igual en todas las calles del gel. Los gráficos de barras muestran la cuantificación de p-Akt/GADPH. Representan la media + desviación estándar de tres experimentos independientes. *p<0.05 vs. control.



Figura 4.41. Cambios en la fosforilación de Akt desencadenados por el tratamiento con **XA5DIE** en la línea celular RD al cabo de **(A)** 24 y **(B)** 48 horas. Se utilizó un anticuerpo anti-p-Akt y un anti-GAPDH para asegurar una igual carga de proteína en todas las condiciones y calles del gel. Los gráficos de barras muestran la cuantificación de p-Akt/GADPH. Representan la media + desviación estándar de tres experimentos independientes. *p<0.05 vs control.

El compuesto **AC5DIE (3b)**, previamente mostrado en este Trabajo de Tesis como el inhibidor más potente de la serie de análogos de acridona, inhibió de manera significativa la fosforilación de Akt. En la línea celular C2C12, **AC5DIE** logró una inhibición notable tanto en las concentraciones de 0.5 μ M como de 1.0 μ M, en ambos tiempos evaluados (**Tabla 4.42**). Tras 24 horas de tratamiento, se observaron inhibiciones del 85.5±2.9% (porcentaje de inhibición±DE) y 81.0±10.8% para las concentraciones de 0.5 y 1.0 μ M, mientras que al cabo de 48 horas estas cifras fueron de 85.3±4.5% y 58.9±1.5%, respectivamente. En la línea celular RD, el comportamiento de **AC5DIE** fue más variable: tras 24 horas de tratamiento, la inhibición a 0.5 μ M fue significativa (56.8±3.5%), pero a 1.0 μ M las diferencias entre experimentos no permitieron confirmar una inhibición concluyente (51.3±48.7%). No

obstante, luego de 48 horas de tratamiento, **AC5DIE** mostró una inhibición más contundente a 1.0 μM (80.5 ± 1.7%).

En comparación con **AC5DIE**, **XA5DIE** también mostró efectos inhibitorios sobre la fosforilación de Akt, manteniendo una fuerte actividad en ambos modelos celulares. Las diferencias entre estos compuestos destacan la versatilidad de la estructura de xantona en la modulación de vías de señalización clave involucradas en la progresión tumoral ^{1,27,100,132,137,139–143}. En las células C2C12, **XA5DIE** inhibió la fosforilación de Akt tanto a 0.5 μ M (porcentaje de inhibición±DE: 64.3±4.9%) como a 1.0 μ M (48.8±3.9%) a las 24 horas, con un efecto más pronunciado a la concentración de 1.0 μ M tras 48 horas de tratamiento (88.6±13.3%). En las células RD, la inhibición de Akt por **XA5DIE** fue evidente a 0.5 (38.5±21.2%) y 1.0 μ M (46.2±3.5%) tras 24 horas de tratamiento, mientras que a las 48 horas el efecto inhibitorio solo se mantuvo a la concentración más baja (29.6±15.9%).

Al comparar estos resultados con el inhibidor de referencia LY294002, observamos que **XA5DIE** presentó una inhibición superior en la línea celular C2C12, particularmente cuando fue empleado en una concentración de 1.0 µM durante 48 horas, donde logró un 88.6±13.3% de inhibición frente al 78.3±4.7% obtenido con LY294002 a 10 µM. Estos hallazgos sugieren que **XA5DIE** podría tener una mayor efectividad que el inhibidor estándar comercial en ciertas condiciones experimentales.

Línea celular	C2C12		R	D
Condiciones	24 horas	48 horas	24 horas	48 horas
	Inhibición (% ± DE)		Inhib (% ±	ición : DE)
ΧΑ5DIE 0.5 μΜ	64.3±4.9	53.0±14.5	38.5±21.2	29.6±15.9
ΧΑ5DIE 1.0 μΜ	48.8±3.9	88.6±13.3	46.2±3.5	18.6±34.7
AC5DIE 0.5 μΜ	85.5±2.9	85.3±4.5	56.8±3.5	28.4±10.5
AC5DIE 1.0 μM	81.0±10.8	58.9±1.5	51.3±48.7	80.5±1.7
LY294002 10.0 µM		78.3±4.7		76.8±8.4

Tabla 4.42. Comparación de los porcentajes de inhibición de Akt ejercidos por **XA5DIE, AC5DIE** y LY294002 en células C2C12 y RD. Se muestra el porcentaje ± desvío estándar vs. la condición con DMSO (Control).

Como se ha señalado en el Capítulo 1, otra vía de señalización importante en la proliferación celular es la vía que involucra a ERK1/2, también conocida como MAPK p42/p44^{78,89,118,126,144,145}. Por esta razón, se evaluaron los efectos del tratamiento con **XA5DIE** sobre la fosforilación de ERK1/2, en las líneas C2C12 (**Figura 4.43**) y RD (**Figura 4.44**). Las condiciones experimentales fueron las siguientes:

- 1) DMSO
- 2) XA5DIE (6) 0.5 µM
- 3) XA5DIE (6) 1.0 µM

Después del tratamiento con **XA5DIE** a 0.5 µM en la línea celular C2C12, se observó una reducción significativa en la fosforilación de ERK1/2 después de 24 horas, pero este efecto no fue reproducible a las 48 horas. A 1.0 µM, no se observaron cambios significativos en la fosforilación de ERK1/2, y esto puede deberse a la variabilidad que se observa entre los diferentes experimentos, como se muestra en la **Figura 4.43 (A y B)**.



Figura 4.43. Cambios en la fosforilación de ERK1/2 desencadenados por el tratamiento con **XA5DIE** en la línea celular C2C12 a **(A)** 24 y **(B)** 48 horas. Se utilizó un anticuerpo anti-fosfo-ERK1/2 y un anti-GAPDH para asegurar una igual carga de proteína en todas las calles del gel. Los gráficos de barras muestran la cuantificación de p-ERK1/2/GADPH. Representan la media + desviación estándar de tres experimentos independientes. *p<0.05, **p< 0.01, ***p<0.001 vs. control.



Figura 4.44. Cambios en la fosforilación de ERK1/2 desencadenados por el tratamiento con **XA5DIE** en la línea celular RD a **(A)** 24 y **(B)** 48 horas. El *Western blot* se realizó utilizando un anticuerpo anti-fosfo-ERK1/2. Se empleó anti-GAPDH para asegurar una igual carga de proteína en todas las calles del gel. Los gráficos de barras muestran la cuantificación de p-ERK1/2/GADPH. Representan la media + desviación estándar de tres experimentos independientes.

Los resultados obtenidos del tratamiento con **XA5DIE** en la línea celular RD (**Figura 4.44, A y B**), no permitieron determinar un efecto significativo sobre la fosforilación de ERK1/2 después de 24 y 48 horas de tratamiento. Es posible que estos efectos no hayan podido evidenciarse debido a la variabilidad entre experimentos, ya que las células pudieron encontrarse no responsivas al momento de realizar los tratamientos correspondientes.

4.4.4 Efectos de los compuestos AC5DIE y XA5DIE sobre la migración celular

La migración celular es el proceso por el cual una célula se desplaza a través de los tejidos o en la superficie de una placa de cultivo, en el cual intervienen expansiones citoplasmáticas, llamadas lamelipodios y filopodios. En muchos casos la migración celular puede compararse con el grado de invasividad de las células cancerosas, y en tejido normal se lo compara con el grado de cicatrización luego de una injuria.

Se realizaron ensayos de herida con las siguientes condiciones experimentales:

- 1) DMSO
- 2) AC5DIE (3b) 0.5 µM
- 3) AC5DIE (3b) 1.0 µM
- 4) XA5DIE (6) 0.5 µM
- 5) XA5DIE (6) 1.0 µM

En la línea celular C2C12 (**Figura 4.45**), en el control con DMSO luego de 23 horas se observó un cierre completo de la herida (cierre del 100%). El tratamiento con el compuesto **XA5DIE** a la dosis más baja (0.5 μ M) redujo el cierre de la herida en un 79.7%, y a la dosis más alta (1.0 μ M) el cierre de la herida fue ligeramente mayor y menos afectado por el tratamiento, lo que resultó en un cierre del 89.6%. Cuando este mismo tipo celular fue tratado con el compuesto **AC5DIE**, la cicatrización de la herida se vio gravemente afectada a una concentración de 0.5 μ M, con un cierre de la herida de tan solo el 55.6%. Esto fue aún más pronunciado a una concentración de 1.0 μ M, lo que resultó en un cierre de solo el 50.2%. Estos datos se presentan en la **Tabla 4.46**.

En la línea celular RD (**Figura 4.47**), el cierre de la herida en la condición correspondiente al control (DMSO) fue del 89.8%. Cuando las células se expusieron a **XA5DIE**, el cierre de la herida se redujo. Se observaron efectos similares en ambas dosis ensayadas, 0.5 y 1.0 µM, lo que resultó en un cierre del 75.5% y 73.8%, respectivamente. El tratamiento con el compuesto **AC5DIE**, provocó una reducción en el cierre de la herida de un 56.1% (con 0.5 µM de **AC5DIE**), mientras que la concentración más alta de este compuesto (1.0 µM) redujo el cierre de la herida en un 70.8%. Estos datos se presentan en la **Tabla 4.48**.

Cuando Akt está hiperactivado, las células exhiben un aumento en la mitosis y la migración, acelerando el proceso de cierre de heridas. Esta hiperactividad también influye en la respuesta a daños celulares. Inhibir la vía PI3K/Akt con fármacos específicos, como puede ser el caso de **XA5DIE** y **AC5DIE** puede revertir estos efectos, sugiriendo que Akt es un regulador clave de la dinámica celular durante el proceso de curación y proliferación en este contexto ¹⁴⁶.

C2C12



Figura 4.45. Efecto de los compuestos **XA5DIE** y **AC5DIE** a 0.5 y 1.0 µM sobre el cierre de la herida en la línea celular C2C12. Las fotomicrografías se tomaron al inicio del tratamiento (0 horas), a un tiempo intermedio (6 horas) y al final del tratamiento (23 horas). Las fotomicrografías son representativas de uno de los experimentos realizados, tomadas con un aumento de 20X.

C2C12			
Condiciones	Área libre 0 horas	Área libre 23 horas	Porcentaje de cierre de la herida (%)
DMSO	3126383	0	100.0
AC5DIE 0.5 μM	2197959	976023	55.6
AC5DIE 1.0 μM	2365555	1177792	50.2
ΧΑ5DIE 0.5 μΜ	2359581	478921	79.7
ΧΑ5DIE 1.0 μΜ	2717445	283721	89.6

Tabla 4.46. Efecto de los compuestos **XA5DIE** y **AC5DIE** a 0.5 y 1.0 μM sobre el cierre de la herida en la línea celular C2C12. Área de la herida al inicio (0 horas) y al final del tratamiento (23 horas), indicando el porcentaje de cierre de la herida.



RD

Figura 4.47. Efecto de los compuestos **XA5DIE** y **AC5DIE** a 0.5 y 1.0 µM sobre el cierre de la herida en la línea celular RD. Las fotomicrografías se tomaron al inicio del tratamiento (0 horas), en un tiempo intermedio (6 horas) y al finalizar el tratamiento (23 horas). Las fotomicrografías son representativas de uno de los experimentos realizados, tomadas con un aumento de 20X.

RD			
Condiciones	Área libre 0 horas	Área libre 23 horas	Porcentaje de cierre de la herida (%)
DMSO	4538366	462123	89.8
AC5DIE 0.5 μM	3852199	1194979	56.1
AC5DIE 1.0 μM	2660207	776411	70.8
ХА5DIE 0.5 µМ	2480872	607558	75.5
ΧΑ5DIE 1.0 μΜ	3992959	1045506	73.8

Tabla 4.48. Efecto de los compuestos **XA5DIE** y **AC5DIE** a 0.5 y 1.0 μM sobre el cierre de la herida en la línea celular RD. Área de la herida al inicio (0 horas) y al final del tratamiento (23 horas), indicando el porcentaje de cierre de la herida.

El impacto de **XA5DIE** en la migración celular reveló efectos inhibitorios moderados en ambas líneas celulares, alineándose con su papel en la inhibición de la proliferación. De manera notable, en la prueba de cierre de heridas, el punto temporal de 23 horas coincide con el tiempo de duplicación celular tanto para las células C2C12¹¹⁵ como para la línea celular RD ¹¹⁶, lo que representa el tiempo necesario para que se complete un ciclo celular. La asociación entre la inhibición de Akt y la reducción en el cierre de heridas puede deberse a la implicación de Akt en procesos celulares clave como la proliferación, la migración y la cicatrización.

Para poder complementar estas investigaciones, se realizaron ensayos de citometría de flujo por incorporación de yoduro de propidio, con la finalidad de evaluar los efectos del derivado de xantona **XA5DIE** sobre el ciclo celular cuando es empleado en concentraciones de 0.5 y 1.0 µM durante 24 y 48 horas en la línea celular C2C12 (**Figura 4.49, A y B**) y RD (**Figura 4.50, A y B**).



Contenido de ADN

A)

□%G1

□%S

□%G2



Figura 4.49. Progresión del ciclo celular en células musculares C2C12 durante (A) 24 y (B) 48 horas. Las células se tripsinizaron, se tiñeron con yoduro de propidio y se cuantificó el contenido de ADN mediante citometría de flujo. Los paneles de la izquierda muestran los histogramas de ADN representativos y los paneles de la derecha muestran las cuantificaciones de los histogramas de ADN que indican los porcentajes de células en las fases G1, S y G2. El tratamiento a 24 horas fue realizado en un único experimento, mientras que los valores obtenidos en el tratamiento a 48 horas provienen de dos experimentos independientes.





Figura 4.50. Progresión del ciclo celular en células de la línea RD durante **(A)** 24 y **(B)** 48 horas. Las células se tripsinizaron, se tiñeron con yoduro de propidio y se cuantificó el contenido de ADN mediante citometría de flujo. Los paneles de la izquierda muestran los histogramas de ADN representativos y los paneles de la derecha muestran las cuantificaciones de los histogramas de ADN que indican los porcentajes de células en las fases G1, S y G2. El tratamiento a 24 horas fue realizado en un único experimento, mientras que los valores obtenidos en el tratamiento a 48 horas provienen de dos experimentos independientes.

Tras 24 horas de tratamiento en la línea celular C2C12, el compuesto **XA5DIE** no muestra cambios significativos en los porcentajes celulares distribuidos en las diferentes fases del ciclo celular en comparación con la condición control. Los ensayos realizados a 48 horas de tratamiento con 0.5 µM de **XA5DIE** parecen evidenciar un aumento en la población de células en la fase S en desmedro de las que se encuentran en la fase G1.

Por el contrario, en la línea celular RD, luego de 24 horas de tratamiento la condición correspondiente al control con DMSO presenta un incremento en la fase S, en desmedro de una disminución en la fase G1, esto puede deberse a que las células presentes en esa condición no se encontraban responsivas al momento de recibir el tratamiento. En cuanto al tratamiento realizado a 48 horas en esta línea celular, el compuesto **XA5DIE** no produce cambios significativos sobre los porcentajes celulares en cada una de las fases del ciclo celular con respecto al control con DMSO.

Sin embargo, debido a los desvíos observados entre las réplicas de los experimentos y la falta de un pool de datos más grande, no se puede extraer conclusiones determinantes con respecto al efecto del compuesto **XA5DIE** sobre el ciclo celular. Actualmente se están concentrando esfuerzos en resolver este inconveniente y realizar más repeticiones de estos ensayos y también en ver la posibilidad de realizar análisis por citometría de flujo en células expuestas al compuesto **AC5DIE**.

En conclusión, **XA5DIE** emerge como un candidato prometedor para la terapia anticancerígena, particularmente a concentraciones de 1.0 µM durante 24 y 48 horas, debido a sus efectos selectivos sobre la viabilidad de células tumorales y su fuerte inhibición de la vía PI3K/Akt.

CAPÍTULO 5: OTRAS INVESTIGACIONES DESARROLLADAS DURANTE EL TRANSCURSO DE ESTE TRABAJO DE TESIS DOCTORAL

5.1 Introducción

El campo de la síntesis en química orgánica desempeña un papel clave en el descubrimiento de nuevas sustancias químicas con actividades biológicas y farmacológicas, que pueden ser aprovechadas para desarrollar agentes terapéuticos. Este aspecto es fundamental para el avance de la química medicinal. Los heterociclos son estructuras moleculares cíclicas que contienen al menos un átomo diferente del carbono en su anillo y se encuentran como componentes estructurales principales en diversas clases de fármacos ¹⁴⁷. Esto subraya la relevancia del núcleo heterocíclico en numerosos procesos bioquímicos esenciales. Entre ellos, las tiazolidinonas funcionalizadas ^{148–150} son un grupo destacado que ha sido evaluado como compuestos activos potenciales en estudios farmacéuticos y, por ello, constituyen andamiajes importantes en el diseño de nuevas moléculas versátiles con actividad biológica y anticancerígena ¹⁵¹.

Inspirados por la amplia actividad biológica de las estructuras orgánicas y la importancia de la síntesis diastereoselectiva en la química medicinal, en colaboración con el grupo de las Dras. Ocampo y Mandolesi, se investigó el efecto de las zeolitas en la estereoselectividad de las tiazolidinonas y la bioactividad de los estereoisómeros aislados en cultivos celulares de RMS en comparación con células normales de músculo esquelético.

5.2 Síntesis estereoselectiva de 4-tiazolidinonas catalizada por zeolitas. Evaluación de su potencial en células de músculo esquelético normal y tumoral.

Como se ha mencionado antes, la vía PI3K/Akt es crucial en la regulación de la proliferación, diferenciación, supervivencia y apoptosis celular ^{97,123,152,153}. Debido a que estos procesos se encuentran desregulados en células cancerosas, la regulación de esta ruta se postula como un aspecto relevante en el desarrollo de fármacos anticancerígenos. Las 4-tiazolidinonas son un grupo farmacóforo atractivo dado que tiene múltiples *targets* biológicos ^{148–150}. El objetivo de este estudio fue evaluar la actividad catalítica de zeolitas en reacciones multicomponentes asistidas por microondas con el fin de obtener de manera diastereoselectiva los heterociclos de interés e investigar su actividad antitumoral y, en particular, su efecto sobre la proteína quinasa Akt en los dos modelos celulares experimentales ya presentados: C2C12, mioblastos murinos normales y RD, células de RMS humano.

Dada la amplia variedad de aplicaciones biológicas reportadas para el núcleo de 4-tiazolidinona **(10)**, se exploraron las mejores condiciones de reacción para la síntesis estereoselectiva de **10**. Se estudió el

CAPÍTULO 5: OTRAS INVESTIGACIONES DESARROLLADAS DURANTE EL TRANSCURSO DE ESTE TRABAJO DE TESIS DOCTORAL

efecto de la variación del solvente y la incorporación de diferentes zeolitas como catalizadores ácidos de Lewis en la reacción tricomponente asistida por microondas entre 2,3:4,5-di-O-isopropiliden-β-Darabino-hexos-2-ulo-2,6-piranosa (7), ácido tioglicólico (8) y diferentes aminas heteroaromáticas (9a-c) para la síntesis diastereoselectiva de 4-tiazolidinonas (10a-c). El intermediario I generado en la reacción es esencial para la síntesis de los productos. Teniendo en cuenta que las zeolitas ejercen diferentes efectos como ácidos de Lewis dependiendo del solvente utilizado, se comenzó con la evaluación de las condiciones para la reacción tricompontente asistida por microondas (300 W, 120 °C), con el fin de seleccionar la más adecuada, tanto en la diastereoselectividad como en el rendimiento de la reacción. Los resultados obtenidos con metanol y etanol como solventes fueron muy similares. Se obtuvieron productos tipo 10 con buenos rendimientos como mezcla diastereoselectividad de la reacción no se ve afectada y estos materiales mantienen su actividad catalítica en presencia de solventes polares próticos, se decidió utilizar etanol como un solvente económico y ecológico, que permitió evaluar únicamente el efecto de las zeolitas como catalizadores (Figura 5.1).



Figura 5.1. Condiciones de reacción: Reacción multicomponente en un solo paso asistida por microondas entre 2,3:4,5-di-O-isopropiliden- β -D-arabino-hexos-2-ulo-2,6-piranosa (7), ácido tioglicólico (8), diferentes aminas heteroaromáticas (9a-c) y solvente, a 300 W y 120 °C durante 30 minutos.

Cuando la reacción se llevó a cabo con AlCl₃ como ácido de Lewis no mostró resultados significativos, ya que se formaron distintos productos y la relación diastereoisomérica observada en los productos de tipo **10** fue deficiente, junto con un rendimiento de moderado a bajo. Esto se debió probablemente a que AlCl₃ no fue capaz de inducir adecuadamente la diastereoselectividad de la reacción.

CAPÍTULO 5: OTRAS INVESTIGACIONES DESARROLLADAS DURANTE EL TRANSCURSO DE ESTE TRABAJO DE TESIS DOCTORAL

Se utilizaron diferentes zeolitas comerciales como catalizadores ácidos de Lewis "voluminosos", tales como Mordenita, Zeolita 13X, Zeolita molecular 13, Zeolita 4A y Zeolita ZSM-5, con el fin de estudiar no solo el efecto catalítico de estos ácidos de Lewis, sino también evaluar cómo su tamaño afecta la quimio y diastereoselectividad de la reacción. Los mejores resultados se obtuvieron con las zeolitas: ZSM-5, Mordenita y 13X. Se realizaron estudios de recuperación en los que se verificó que pueden reutilizarse al menos cuatro veces para la producción selectiva de 4-tiazolidinonas sin pérdida de actividad. Se utiliza 20 mg del catalizador, que luego se extrae simplemente del producto de reacción por filtración. Posteriormente, se lava con agua, etanol-acetona y se seca a 200 °C para permitir la reutilización del catalizador.

5.2.1 Efecto de los compuestos 10a-cii sobre la viabilidad celular en las líneas celulares C2C12 y RD

Se evaluó la viabilidad celular en las líneas C2C12 y RD luego del tratamiento con los compuestos **10acii**. La **Figura 5.2 (A)** presenta fotomicrografías de fluorescencia de estas líneas celulares tratadas con los diferentes compuestos **10a-cii** a una concentración de 10 μ M y su correspondiente control con DMSO (el vehículo de dichos compuestos, empleado en la misma proporción que la contenida en los compuestos), durante un período de 24 horas. Se utilizó DAPI para visualizar los núcleos celulares que pueden observarse en azul y *Mitotracker* que solo ingresa al interior de las mitocondrias metabólicamente activas permitiendo visualizarlas en color rojo, como se detalló en la Sección Experimental (Capítulo 3). En las células C2C12, no se observaron cambios celulares morfológicos ni en la distribución de la red mitocondrial, así como tampoco en la densidad de las células comparando el control y los diferentes tratamientos, manteniéndose una apariencia y distribución mitocondrial y celular consistente. Además, se observó una similitud en el estado de las mitocondrias entre los tratamientos y el control. En contraste, en las células RD, el tratamiento con **10bii** mostró una disminución significativa en la densidad de las células en comparación con el control y con los compuestos **10aii** y **10cii**, sugiriendo un efecto dependiente de **10bii** sobre el crecimiento celular sin alterar la red mitocondrial (**Figura 5.2, A**).

La viabilidad celular también se evaluó tras la exposición a los diferentes compuestos a una concentración de 10 µM durante 24 horas, utilizando azul de tripán para diferenciar entre células muertas y vivas, y posterior recuento de células en cámara de Neubauer. La **Figura 5.2 (B)** muestra que, en la línea celular C2C12, no se observaron diferencias significativas en la proporción de células vivas entre los grupos tratados y el control, indicando una tolerancia similar a los compuestos. En cambio, en la línea celular RD, el tratamiento con el compuesto **10bii** presentó una proporción significativamente reducida de células vivas en comparación con el control y los demás tratamientos
CAPÍTULO 5: OTRAS INVESTIGACIONES DESARROLLADAS DURANTE EL TRANSCURSO DE ESTE TRABAJO DE TESIS DOCTORAL

(compuestos **10aii** y **10cii**), resaltando una respuesta específica del compuesto **10bii** en la línea celular cancerosa. Estos resultados sugieren que estos compuestos pueden tener efectos diferentes sobre la viabilidad celular, dependiendo de la línea celular, lo que subraya la importancia de considerar la especificidad celular en futuras investigaciones y aplicaciones terapéuticas.



B)



Figura 5.2. Efecto de los compuestos **10a-cii** sobre la viabilidad celular en las líneas celulares C2C12 y RD. (A) Fotomicrografías de fluorescencia que muestran las líneas celulares C2C12 y RD que han sido tratadas con los compuestos **10a-cii** (10 μM) y su respectivo control con DMSO durante un período de 24 horas. Se utilizó DAPI (azul) para la visualización de los núcleos y *MitoTracker* (rojo) para visualizar las mitocondrias metabólicamente activas. (B) Evaluación de la viabilidad celular tras la exposición a los compuestos **10a-cii** durante 24 horas. Se empleó la tinción con azul de tripán y posterior conteo celular en cámara de Neubauer. El número de células muertas no fue significativo (datos no

CAPÍTULO 5: OTRAS INVESTIGACIONES DESARROLLADAS DURANTE EL TRANSCURSO DE ESTE TRABAJO DE TESIS DOCTORAL

mostrados). Los gráficos de barras representan el número de células vivas en *Fold* de tres experimentos independientes. *p<0.05 vs. control.

5.2.2 Cambios en la activación de Akt inducidos por los compuestos 10a-cii en las líneas celulares C2C12 y RD

Finalmente, determinamos las acciones biológicas de los compuestos **10a-cii** en la activación de Akt. Los compuestos se utilizaron a una concentración de 10 µM durante 24 horas, empleando el DMSO como control. Los ensayos de *Western blot* se realizaron utilizando el anticuerpo específico anti-fosfo Ser473 de Akt, que reconoce específicamente la forma activa de Akt. La **Figura 5.3 (A)** muestra que, en las células C2C12, el compuesto **10aii** produce una disminución de 46.12% (±20.38) y **10bii** produce una disminución también significativa de 24.53% (±18.70) en la fosforilación de Akt (activación) luego de 24 horas de tratamiento. En las células RD (**Figura 5.3, B**), los mismos compuestos ejercen una disminución significativa en la fosforilación de Akt (activación). En la línea celular tumoral, el compuesto **10aii** produce una disminución estadísticamente significativa de 32.54% (±22.66), mientras que el compuesto **10bii** causa una disminución de 45.92% (±9.82). El compuesto **10cii** no mostró efectos significativos sobre la activación de Akt en ningún tipo celular estudiado.



Figura 5.3. Efecto de los compuestos **10a-cii** sobre la fosforilación de Akt en células **(A)** C2C12 y **(B)** células RD. Se utilizó un anticuerpo anti-Akt fosforilada en Ser473 y un anti-GADPH para asegurar una carga proteica equivalente en todos los carriles de los geles. Los gráficos de barras representan las

CAPÍTULO 5: OTRAS INVESTIGACIONES DESARROLLADAS DURANTE EL TRANSCURSO DE ESTE TRABAJO DE TESIS DOCTORAL

cuantificaciones de p-Akt/GADPH de tres experimentos independientes. Se muestran *blots* representativos. *p<0.05 vs. control.

Los derivados de 4-tiazolidinonas han sido ampliamente investigados por sus propiedades anticancerígenas. En particular, varios estudios han demostrado que estas moléculas exhiben actividad citotóxica contra diversas líneas celulares tumorales, lo que las convierte en compuestos prometedores para el diseño de fármacos anticancerígenos. Por ejemplo, el compuesto Les-3833, un derivado de 4-tiazolidinona, mostró actividad citotóxica significativa en ensayos in vitro contra células de glioma humano (U251) y de rata (C6), comparables a los de la Doxorrubicina, un potente agente quimioterapéutico, lo que subraya su capacidad para actuar contra tumores malignos ¹⁵⁴.

5.3 Conclusión

Se pudo sintetizar diastereoselectivamente tres 4-tiazolidinonas **(10a-cii)** con excelentes rendimientos y tiempos cortos de reacción, usando la zeolita 13X.

El tratamiento con los compuestos **10aii** y **10bii**, provocó una reducción significativa en la fosforilación de Akt en mioblastos normales (C2C12) y en células de RMS (RD), aunque sólo el compuesto **10bii** produjo una significativa reducción en la viabilidad celular en la línea RD, mientras que el resto de los compuestos no causó variaciones significativas. Por lo que podemos concluir que el compuesto **10bii**, se perfila como un prometedor inhibidor de Akt, proteína que se encuentra frecuentemente hiperactivada en numerosos tipos de cáncer, incluyendo el RMS ¹²⁶.

CAPÍTULO 6: CONCLUSIONES GENERALES

6.1 Sobre el enfoque interdisciplinario

En el desarrollo de este Trabajo de Tesis Doctoral, he adquirido una experiencia significativa en el manejo de técnicas en dos entornos de investigación diferentes pero complementarios: Química Orgánica y Química Biológica. Aprendí a conducirme de manera eficiente en ambos entornos, desde poder lograr el diseño, la síntesis y purificación de compuestos bioactivos hasta la evaluación de los mismos aplicando técnicas avanzadas de cultivo celular, biología celular y molecular. Esta experiencia interdisciplinaria fue clave para comprender el impacto de los compuestos sintetizados en los sistemas biológicos, y me permitió abordar la investigación de manera integral.

En el laboratorio de Química Orgánica perteneciente al INQUISUR (CONICET-UNS), bajo la codirección del Dr. Darío C. Gerbino, desarrollé habilidades en el diseño, la síntesis y purificación de nuevos compuestos bioactivos, incluyendo los potenciales inhibidores de Akt basados en derivados de xantona (dibenzo-4-pirona) y acridona (dibenzo-4-piridona). Esta experiencia me permitió desarrollar técnicas novedosas en la creación de nuevas estructuras químicas y llevar a cabo la caracterización espectroscópica de las mismas.

En el laboratorio de Química Biológica perteneciente al INBIOSUR (CONICET-UNS), bajo la dirección de la Dra. Claudia Buitrago, cerré el ciclo de investigación doctoral evaluando la actividad biológica de los compuestos previamente sintetizados. Realicé ensayos biológicos utilizando cultivos bidimensionales de las líneas celulares RD y C2C12, centrando los estudios en la vía PI3K/PDK1/Akt, un blanco terapéutico de gran interés contra el cáncer.

Además, en colaboración con la Dra. Cintia Menéndez del INQUISUR, se llevaron a cabo estudios teóricos-computacionales que ayudaron a racionalizar el modo de unión ligando-blanco molecular, complementando los resultados biológicos obtenidos.

En forma de trabajo en colaboración con las Dras. Ocampo y Mandolesi del INQUISUR, se evaluó la actividad catalítica de zeolitas en reacciones multicomponentes asistidas por microondas con el fin de obtener de manera diasteroselectiva los heterociclos de interés e investigar su actividad antitumoral y, en particular, su efecto sobre la quinasa Akt. Las conclusiones sobre estas investigaciones se encuentran al finalizar la descripción de estos resultados (ver Capítulo 5: Otras investigaciones desarrolladas durante el transcurso de este Trabajo de Tesis Doctoral).

Estas experiencias han sido fundamentales para la realización de las investigaciones y la obtención de resultados precisos en ambas áreas, ampliando mi conocimiento y habilidades en disciplinas complementarias de la ciencia.

6.2 Sobre los resultados de la Síntesis Química

Se logró la síntesis exitosa de una serie de derivados de acridona y xantona, enfrentando y resolviendo los desafíos relacionados con la purificación y caracterización, en particular del precursor 1,3-DHA. El trabajo en el Laboratorio de Química Orgánica me permitió adquirir un entrenamiento intensivo en técnicas operacionales de rutina en un Laboratorio de Síntesis Orgánica, como por ejemplo la manipulación de líneas de Schlenk bajo atmósfera inerte, la separación y purificación de compuestos orgánicos por métodos físico-mecánicos como destilación a presión reducida, recristalización y cromatografía en columna, como así también el uso de diversas técnicas analíticas de caracterización estructural tales como RMN, espectroscopia FT-IR y CG-EM, habilidades esenciales para la síntesis de compuestos bioactivos.

6.3 Sobre los resultados de los Ensayos Biológicos y de Modelado Molecular

La vía de señalización PI3K/PDK1/Akt es fundamental en la proliferación, supervivencia y apoptosis celular, lo que la convierte en un objetivo atractivo para dirigir las terapias contra el cáncer. La desregulación de esta vía se ha relacionado con el crecimiento tumoral y la resistencia al tratamiento, en particular en cánceres con hiperactivación de Akt.

En un primer momento, los ensayos biológicos fueron realizados empleando concentraciones que se consideran elevadas (10, 20 y 50 μ M) de distintos compuestos sintetizados. La falta de réplicas de algunas investigaciones y la variabilidad experimental dificultaron la determinación precisa de los efectos. Es de relevancia destacar que al observar la variabilidad de los resultados fue que se decidió no continuar con estas condiciones y no realizar más réplicas experimentales de manera de optimizar los recursos y poder conducir las investigaciones a resultados reproducibles.

En la línea celular C2C12, cuando los compuestos fueron empleados en concentraciones que se consideran elevadas, en particular a 50 µM durante 30 minutos, se pudo evidenciar que el compuesto **AC5DIE (3b)** provocó una inhibición significativa de la fosforilación de Akt. Ningún otro abordaje experimental tuvo un efecto significativo a 30 minutos de tratamiento. A 90 minutos, también se evidenciaron efectos de inhibición de **AC5DIE (3b)** y **AC5MOR (3c)** cuando fueron empleados a altas concentraciones. Durante 24 horas de tratamiento, **AC5MOR (3c)** a 10 µM provocó una disminución en

CAPÍTULO 6: CONCLUSIONES GENERALES

la activación de Akt; mientras que a 48 horas de tratamiento no se observaron diferencias significativas en la fosforilación de Akt con ninguno de los compuestos evaluados en la línea celular C2C12.

Al trabajar con concentraciones que se consideran elevadas de los compuestos se puso de manifiesto una toxicidad considerable, principalmente atribuida a los altos niveles de DMSO necesarios para vehiculizar los compuestos. El DMSO, en concentraciones superiores al 0.1%, es conocido por ser tóxico para las células ¹²⁴, lo que pudo haber enmascarado los efectos biológicos reales de los compuestos. Esto llevó a no poder determinar bajo estas condiciones su potencial inhibidor sobre la vía PI3K/PDK1/Akt y su impacto sobre la viabilidad celular. Al utilizar concentraciones menores de los compuestos, se eliminó la toxicidad atribuida al DMSO, lo que permitió obtener resultados reproducibles, revelando el verdadero potencial de los compuestos como inhibidores de Akt y moduladores de la viabilidad celular. Esta decisión metodológica fue fundamental para evitar interpretaciones erróneas sobre la actividad de los compuestos y su perfil de seguridad.

Los resultados obtenidos con **AC5PIR (3d)** y **AC5PIP (3e)** sugieren que su mecanismo de acción podría no estar directamente relacionado con la vía PI3K/PDK1/Akt y que podrían tener menor eficacia en comparación con otros derivados de acridona. Estos químicos se evaluaron únicamente en la línea celular C2C12 debido a los resultados preliminares limitados observados en los ensayos y a que no mostraron una inhibición significativa y considerable de Akt, lo que justificó su exclusión en experimentos posteriores con la línea RD.

Los estudios con AC4MOR (3a), AC5DIE (3b), AC5MOR (3c) y AC6MOR (3f), que se sintetizaron siguiendo procedimientos operativos simples, mostraron que el compuesto AC5DIE (3b) a 0.5 μ M inhibió Akt de forma más potente que LY294002 (10 μ M) en células C2C12 a las 24 y 48 horas de tratamiento.

La diferencia en el patrón de respuesta de las células C2C12 a la exposición dependiente del tiempo con derivados de 1,3-DHA permite hipotetizar que, como han publicado otros autores, el comportamiento celular relacionado con la inhibición de Akt es dependiente del tiempo.

Es importante destacar que, en la línea celular tumoral, aunque solo **AC6MOR (3f)** a la mayor concentración de 1.0 µM inhibió efectivamente Akt a las 24 horas de tratamiento, los cuatro nuevos compuestos **AC4MOR (3a)**, **AC5DIE (3b)**, **AC5MOR (3c)** y **AC6MOR (3f)** a esta concentración fueron efectivos en inhibir Akt en células RD a las 48 horas de tratamiento. Los niveles basales de fosforilación de Akt son siempre más altos en células RD que en células C2C12. Esto nos permite plantear la hipótesis de que la respuesta de las células RD a los nuevos compuestos es diferente de la observada en C2C12 en los niveles de concentración y tiempos de estimulación.

El derivado de acridona **AC5DIE (3b)** a pesar de haber demostrado una potente inhibición de la activación de Akt en células C2C12, provocó resultados muy variables en los ensayos realizados en las células RD. En base a esto, se sintetizó, purificó, caracterizó y evaluó su análogo oxigenado, el compuesto **XA5DIE (6)**, un derivado de xantona.

XA5DIE (6) demostró una citotoxicidad selectiva en los modelos celulares: redujo significativamente la viabilidad celular de células RD a una concentración de 1.0 μM después de 24 y 48 horas de tratamiento y, por el contrario, no afectó la viabilidad de las células musculares esqueléticas normales (C2C12). Esto destaca su actividad selectiva en células neoplásicas y es una ventaja crítica en el desarrollo de terapias anticancerígenas dirigidas, ya que minimiza los efectos no deseados en células sanas. Esta reducción selectiva de la viabilidad celular en células de RMS fue respaldada además por otros ensayos que revelaron una disminución en la densidad celular en RD tras el tratamiento con **XA5DIE (6)**.

La correlación entre los cambios en la viabilidad celular y el mantenimiento de la integridad mitocondrial refuerza el potencial anticancerígeno selectivo del compuesto **XA5DIE (6)**, que podría estar dado por mecanismos de apoptosis que en fases tempranas no involucraran a las mitocondrias, por el contrario, **AC5DIE (3b)** no produjo cambios en la viabilidad celular de ninguna de las dos líneas celulares empleadas.

Aunque **AC5DIE (3b)** exhibió una potente inhibición de Akt, su análogo oxigenado **XA5DIE (6)** puede ofrecer distintas ventajas en ciertas condiciones experimentales. Las diferencias entre estos compuestos destacan la versatilidad de la estructura de xantona en la modulación de vías de señalización clave involucradas en la progresión tumoral.

El impacto de **XA5DIE (6)** en la migración celular reveló efectos inhibitorios moderados en ambas líneas celulares, alineándose con su papel en la inhibición de la proliferación y el movimiento celular. La asociación entre la inhibición de Akt y la reducción en el cierre de heridas puede deberse a la implicación de Akt en procesos celulares clave como la proliferación, la migración y la cicatrización. Por lo tanto, la modulación de Akt por los compuestos **XA5DIE (6)** y **AC5DIE (3b)** puede interferir en el correcto cierre de heridas al alterar los mecanismos celulares necesarios.

Además de PI3K/PDK1/Akt, la vía MAPK/ERK1/2 desempeña un papel crítico en la señalización celular, controlando procesos esenciales como el crecimiento, la proliferación, la supervivencia, la apoptosis y la motilidad. Curiosamente, **XA5DIE (6)** también influyó en la fosforilación de ERK1/2 en las células C2C12, aunque no se observaron cambios significativos en las células RD, posiblemente debido a la variabilidad experimental.

CAPÍTULO 6: CONCLUSIONES GENERALES

XA5DIE (6) emerge como un candidato prometedor para la terapia anticancerígena, particularmente a concentraciones de 1.0 μM durante 24 y 48 horas, debido a sus efectos selectivos sobre la viabilidad de células tumorales y su fuerte inhibición de la vía PI3K/Akt. Como el análogo oxigenado de AC5DIE (3b), XA5DIE (6) ofrece un potencial terapéutico complementario, lo que lo convierte en una opción atractiva para desarrollar nuevas investigaciones. Los estudios futuros deberían centrarse en validar estos resultados en modelos *in vivo* para confirmar el papel de XA5DIE (6) en estrategias de tratamiento contra el cáncer.

El modelado molecular y las simulaciones de dinámica molecular sirvieron para validar a PDK1 como el objetivo molecular de esta nueva serie de derivados de 1,3-DHA. El modelado molecular reveló que el esqueleto de acridona se une en la misma región que el motivo adenina del ligando natural ATP, y también se asemeja al modo de unión del derivado de antrona, PS653. El SMD indica una alta resistencia a la disrupción de las interacciones de enlace de hidrógeno entre el ligando y la proteína, por lo tanto, se podría esperar una alta afinidad de unión y la ocurrencia de complejos estructuralmente estables. Además, las estimaciones de la energía libre de unión absoluta mediante tres métodos diferentes, MM-GBSA, LIE-D y TI, mostraron la misma tendencia y revelaron que la formación del complejo entre **AC5DIE (3b)** (y eventualmente sus congéneres) y PDK1 es termodinámicamente favorable.

Los análisis PCA (Análisis de componentes principales) y DCCM (Matriz de correlación cruzada dinámica) ayudaron a racionalizar el posible acoplamiento alostérico entre el sitio de unión de ATP y el sitio regulador del bolsillo PIF. A diferencia de PS653, **AC5DIE (3b)** indujo un cierre claro del sitio de unión de ATP que podría ayudar a optimizar el acoplamiento alostérico entre estos dos sitios distales de PDK1. Por lo tanto, sería de gran interés estudiar la posible modulación alostérica del sitio regulador del bolsillo PIF por **AC5DIE (3b)** y sus congéneres.

Los estudios de acoplamiento molecular y dinámica demostraron que el compuesto **AC5DIE (3b)** presenta una afinidad significativa por la quinasa PDK1, lo que sugiere que su inhibición de Akt puede estar mediada por su interacción con esta quinasa clave. Los resultados indican que el compuesto establece interacciones intermoleculares estables en el sitio de unión de PDK1, lo que respalda sus efectos inhibidores observados experimentalmente.

Además, la energía libre de unión absoluta para PS653, predicha aquí por el método más riguroso TI, está en estrecha concordancia con los resultados experimentales. Una vez más, se espera una mayor inhibición de PDK1 por parte de **AC5DIE (3b)** en comparación con PS653, según los cálculos de TI. Además, los tres métodos aplicados aquí, MM-GBSA, LIE-D y TI, señalan la misma tendencia y revelan que la formación del complejo **3b**-PDK1 puede ser termodinámicamente favorable. En resumen, estos datos apoyan la inhibición de PDK1 por el nuevo ligando **AC5DIE (3b)** (y sus congéneres) y ayudan a racionalizar el resultado experimental expuesto anteriormente.

Las simulaciones realizadas expusieron dinámicas diferenciales para el dominio catalítico de PDK1 ajustadas por la presencia de los ligandos, donde efectos alostéricos opuestos pueden ser inducidos en el sitio regulador bolsillo PIF por PS653 y **AC5DIE (3b)**. Finalmente, sería de suma importancia corroborar experimentalmente estos resultados en un futuro trabajo.

6.4 Reflexión final

En conjunto, los resultados producidos en la presente Tesis me llevan a reflexionar que estos nuevos prototipos podrían considerarse candidatos iniciales para el desarrollo de nuevos inhibidores de Akt en la ambiciosa búsqueda de nuevos agentes antineoplásicos.

Trabajos generados a partir del desarrollo de esta Tesis Doctoral y otras investigaciones en colaboración

Publicaciones en revistas científicas internacionales con referato

- Ariana W. Hobsteter, Ana P. Irazoqui, Agustina Gonzalez, Agustín S. Picco, Aldo A. Rubert, Claudia G. Buitrago, Marcos J. Lo Fiego, Gustavo F. Silbestri. Acetylated galactopyranosyl nheterocyclic monocarbene complexes of silver (I) as novel anti-proliferative agents in a rhabdomyosarcoma cell line. Bioorganic & Medicinal Chemistry. ISSN: 0968-0896. Vol 107 (2024) 117756. Publicado: Mayo 2024. https://doi.org/10.1016/j.bmc.2024.117756.
- Paula Irazoqui, Cintia A. Menéndez, H. Sebastián Steingruber, Agustina Gonzalez, Gustavo A. Appignanesi, Claudia G. Buitrago, Darío C. Gerbino. *Development of new 1,3-dihydroxyacridone derivatives as Akt pathway inhibitors in skeletal muscle cells*. Bioorganic Chemistry, ISSN: 0045-2068, Tomo: 130, publicado: Octubre 2022. DOI: 10.1016/j.bioorg.2022.106222.
- Ana P. Irazoqui, Agustina Gonzalez, Claudia Buitrago. Effects of calcitriol on the cell cycle of rhabdomyosarcoma cells. Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, ISSN: 0960-0760, Publicado: Junio 2022. DOI: 10.1016/j.jsbmb.2022.106146.
- Fernando J. Lorenzo, Agustina Gonzalez, Ana Paula Irazoqui, Ignacio O. Costilla, Claudia Buitrago, Darío C. Gerbino, Sandra Mandolesi, Romina Ocampo. Study of the zeolite catalysis in the stereoselective synthesis of 4-thiazolidinones. Evaluation of its potential anticancer activity in human rhabdomyosarcoma cells. Enviado a Synthesis.
- Agustina Gonzalez, Ana P. Irazoqui, Pamela Mendioroz, Darío C. Gerbino, Claudia G. Buitrago.
 Evaluation of the therapeutic potential of compound XA5DIE in skeletal muscle cell models. En proceso de redacción.

Publicaciones en Congresos Científicos Internacionales

Jornadas Rioplatenses de Química Medicinal. La Plata, 11-12 abril 2024. Síntesis diastereoselectiva de 4-tiazolidinonas catalizada por zeolitas. Evaluación de su potencial anticancerígeno en células de Rabdomiosarcoma humano. Fernando Lorenzo; Agustina Gonzalez; Ana Paula Irazoqui; Claudia Buitrago; Sandra Mandolesi; Romina A. Ocampo.

PUBLICACIONES ASOCIADAS A ESTE TRABAJO DE TESIS DOCTORAL

- LXVIII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica (SAIC) Reunión Anual de Sociedades de Biociencias. Mar del Plata, 15-17 noviembre 2023. Synthesis and evaluation of a xanthone analogue as a new Akt protein inhibitor in skeletal muscle cells. Gonzalez A., Mendioroz P., Gerbino D., Buitrago C.
- LXVII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica (SAIC) Reunión Anual de Sociedades de Biociencias. Mar del Plata, 16-19 noviembre 2022. New 1,3-dihidroxyacridone derivates: synthesis and evaluation as Akt inhibitors of signaling pathway in skeletal muscle cells. Gonzalez A., Irazoqui A.P., Menéndez C.A., Steingruber H.S., Appignanesi G.A., Buitrago C.G., Gerbino D.C.
- XXIII Simposio Nacional de Química Orgánica (SINAQO) Sociedad Argentina de Investigación en Química Orgánica - Córdoba 2021. *Derivados de 1,3-dihidroxiacridona: diseño y síntesis de nuevos inhibidores de Akt1*. Cintia A. Menéndez, Paula A. Irazoqui, Agustina Gonzalez, H. Sebastián Steingruber, Gustavo A. Appignanesi, Claudia G. Buitrago y Darío C. Gerbino.
- XXII Simposio Nacional de Química Orgánica (SINAQO) Sociedad Argentina de Investigación en Química Orgánica - Mendoza 2019. Novedosos inhibidores de la activación de PI3K/Akt: diseño racional, síntesis y evaluación de su actividad biológica en células del músculo esquelético. H. Sebastián Steingruber, Agustina Gonzalez, Cintia A. Menéndez, A. Paula Irazoqui, Gustavo Appignanesi, Claudia Buitrago, Darío C. Gerbino.

Referencias Bibliográficas

- Saraiva, L. *et al.* Inhibition of protein kinase C by synthetic xanthone derivatives. *Bioorganic Med. Chem.* 11, 1215–1225 (2003).
- 2. Nai-Ki, M. et al. Effects of euxanthone on neuronal differentiation. Life Sci. 66, 347–354 (1999).
- 3. Steingruber, H. S., Mendioroz, P., Diez, A. S. & Gerbino, D. C. A Green Nanopalladium-Supported Catalyst for the Microwave-Assisted Direct Synthesis of Xanthones. *Synth.* **52**, 619–628 (2020).
- 4. Irazoqui, A. P. *et al.* Development of new 1, 3-dihydroxyacridone derivatives as Akt pathway inhibitors in skeletal muscle cells. *Bioorg. Chem.* **130**, 106222 (2022).
- 5. Abou-Shoer, M., Boettner, F. E., Chang, C. J. & Cassady, J. M. Antitumour and cytotoxic xanthones of Psorospermum febrifugum. *Phytochemistry* **27**, 2795–2800 (1988).
- Denny. Acridine Derivatives as Chemotherapeutic Agents. *Curr. Med. Chem.* 9, 1655–1665 (2002).
- 7. Menéndez, C. A. *et al.* Design, synthesis and biological evaluation of 1,3-dihydroxyxanthone derivatives: Effective agents against acetylcholinesterase. *Bioorg. Chem.* **75**, 201–209 (2017).
- Wainwright, M. Acridine A neglected antibacterial chromophore. J. Antimicrob. Chemother. 47, 1–13 (2001).
- 9. Hughes, G. K. & Lahey, F. N. 7/18/13 © 1948 Nature Publishing Group. (1948).
- 10. Nature, T. H. E. Alkaloids of the australian rutaceae : Acronychia baueri. **1**, 3–6 (1949).
- Gniazdowski, M. & Szmigiero, L. Nitracrine and its congeners-An overview. *Gen. Pharmacol.* 26, 473–481 (1995).
- Atwell, G. J., Cain, B. F. & Seelye, R. N. Potential Antitumor Agents. 12. 9-Anilinoacridines. J. Med. Chem. 15, 611–615 (1972).
- Belmont, P., Bosson, J., Godet, T. & Tiano, M. Acridine and Acridone Derivatives, Anticancer Properties and Synthetic Methods: Where Are We Now? *Anticancer. Agents Med. Chem.* 7, 139– 169 (2008).
- Harvey, V. J., Hardy, J. R., Smith, S., Grove, W. & Baguley, B. C. Phase II study of the amsacrine analogue CI-921 (NSC 343499) in non-small cell lung cancer. *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.* 27, 1617–1620 (1991).

- 15. Denny, W. & Baguley, B. Dual Topoisomerase I / II Inhibitors in Cancer Therapy. *Curr. Top. Med. Chem.* **3**, 339–353 (2003).
- Wieslaw M. Cholody, Sante Martelli,'Jolanta Paradziej-Lukowicz, and J. K. 5-[(Aminoalkyl)amino]imidazo[4,5,1-de]acridin-6-ones as a Novel Class of Antineoplastic Agents. Synthesis and Biological Activity. 33, 49–52 (1990).
- Wieslaw M. Cholody, it Sante Martelli, and J. K. 8-Substituted 5-[(Aminoalkyl)amino]-6H- vtriazolo[4,5,1-de lacridin-6-ones as Potential Antineoplastic Agents. Synthesis and Biological Activity. 1660, 2852–2856 (1990).
- Lemke, K. *et al.* Induction of unique structural changes in guanine-rich DNA regions by the triazoloacridone C-1305, a topoisomerase II inhibitor with antitumor activities. *Nucleic Acids Res.* 33, 6034–6047 (2005).
- 19. Isambert, N. *et al.* Evaluation of the safety of C-1311 (SYMADEX) administered in a phase 1 dose escalation trial as a weekly infusion for 3 consecutive weeks in patients with advanced solid tumours. *Eur. J. Cancer* **46**, 729–734 (2010).
- 20. Cholewiński, G., Dzierzbicka, K. & Kołodziejczyk, A. M. Natural and synthetic acridines/acridones as antitumor agents: Their biological activities and methods of synthesis. *Pharmacol. Reports* **63**, 305–336 (2011).
- 21. Kumar, R., Sharma, S. & Prasad, D. Acridones. in *Key Heterocycle Cores for Designing Multitargeting Molecules* 53–132 (Elsevier, 2018). doi:10.1016/B978-0-08-102083-8.00003-0.
- 22. Loiseau, P. M. & Xuong, N. D. Plasmodium berghei mouse model: Antimalarial activity of new alkaloid salts and of thiosemicarbazone and acridine derivatives. *Trop. Med. Int. Heal.* **1**, 379–384 (1996).
- 23. Gamage, S. A. *et al.* Structure-activity relationships for the antileishmanial and antitrypanosomal activities of 1'-substituted 9-anilinoacridines. *J. Med. Chem.* **40**, 2634–2642 (1997).
- 24. Sultanbawa, M. U. S. Xanthonoids of tropical plants. *Tetrahedron* **36**, 1465–1506 (1980).
- Pinto, M. M. M., Sousa, M. E. & Nascimento, M. S. J. Xanthone Derivatives: New Insights in Biological Activities. *Curr. Med. Chem.* 12, 2517–2538 (2005).
- 26. Yang, Z. M. *et al.* Design, synthesis and biological evaluation of novel 1-hydroxyl-3- aminoalkoxy xanthone derivatives as potent anticancer agents. *Eur. J. Med. Chem.* **85**, 487–497 (2014).

- 27. Younghwa. Recent cancer drug development with xanthone structures. J. Pharm. Pharmacol.61, 707–712 (2009).
- Fotie, J. & Bohle, D. S. Pharmacological and biological activities of xanthones. *Antiinfect. Agents* Med. Chem. 5, 15–31 (2006).
- Newman, D. J. & Cragg, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. J. Nat. Prod. 79, 629–661 (2016).
- Liu, H., Jiang, W. & Xie, M. Flavonoids: Recent Advances as Anticancer Drugs. *Recent Pat. Anticancer. Drug Discov.* 5, 152–164 (2010).
- Newman, D. J. & Cragg, G. M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. J. Nat. Prod. 70, 461–477 (2007).
- 32. Martens, S. & Mithöfer, A. Flavones and flavone synthases. *Phytochemistry* **66**, 2399–2407 (2005).
- Verma, A. K. & Pratap, R. The biological potential of flavones. *Nat. Prod. Rep.* 27, 1571–1593 (2010).
- 34. Iwashina, T. The structure and distribution of the flavonoids in plants. *J. Plant Res.* **113**, 287–299 (2000).
- 35. Kunimasa, K. *et al.* Identification of nobiletin, a polymethoxyflavonoid, as an enhancer of adiponectin secretion. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **19**, 2062–2064 (2009).
- 36. Sashidhara, K. V., Kumar, M. & Kumar, A. A novel route to synthesis of flavones from salicylaldehyde and acetophenone derivatives. *Tetrahedron Lett.* **53**, 2355–2359 (2012).
- Valentina, P., Ilango, K., Chander, S. & Murugesan, S. Design, synthesis and α-amylase inhibitory activity of novel chromone derivatives. *Bioorg. Chem.* 74, 158–165 (2017).
- 38. Eseberri, I. *et al.* Effects of physiological doses of resveratrol and quercetin on glucose metabolism in primary myotubes. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, 1–16 (2021).
- Chuang, C. C. *et al.* Quercetin is equally or more effective than resveratrol in attenuating tumor necrosis factor-α-mediated inflammation and insulin resistance in primary human adipocytes. *Am. J. Clin. Nutr.* 92, 1511–1521 (2010).
- 40. Edwards, R. L. *et al.* The Journal of Nutrition Nutrition and Disease Quercetin Reduces Blood Pressure in Hypertensive Subjects 1,2. *J. Nutr* **137**, 2405–2411 (2007).

- 41. Gharbi, S. I. *et al.* Exploring the specificity of the PI3K family inhibitor LY294002. *Biochem. J.* **404**, 15–21 (2007).
- 42. Stein, R. C. & Waterfield, M. D. PI3-Kinase inhibition: A target for drug development? *Mol. Med. Today* **6**, 347–358 (2000).
- 43. Abbott, B. & Thompson, P. Synthetic studies of the phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor LY294002 and related analogues. *Aust. J. Chem.* **56**, 1099–1106 (2003).
- 44. Goodsell, D. S. & Olson, A. J. Automated docking of substrates to proteins by simulated annealing. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma*. **8**, 195–202 (1990).
- 45. Morris, G. M. *et al.* Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. *J. Comput. Chem.* **19**, 1639–1662 (1998).
- 46. Kitchen, D. B., Decornez, H., Furr, J. R. & Bajorath, J. Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: Methods and applications. *Nat. Rev. Drug Discov.* **3**, 935–949 (2004).
- 47. Adcock, S. A. & McCammon, J. A. Molecular dynamics: Survey of methods for simulating the activity of proteins. *Chem. Rev.* **106**, 1589–1615 (2006).
- 48. Frontera, W. R. & Ochala, J. Skeletal Muscle: A Brief Review of Structure and Function. *Behav. Genet.* **45**, 183–195 (2015).
- Yablonka-Reuveni, Z. The Skeletal Muscle Satellite Cell: Still Young and Fascinating at 50. J.
 Histochem. Cytochem. 59, 1041–1059 (2011).
- 50. Camila F. Almeida, Stephanie A. Fernandes, Antonio F. Ribeiro Junior, Oswaldo Keith Okamoto, and M. V. Muscle SC biology, 2016. *Stem Cells Int.* **2016**, (2016).
- 51. Hernández-Almaraz, P., Lugo-Lugo, O., Brassea-Pérez, E., Gaxiola-Robles, R. & Zenteno-Savín,
 T. Morphometric Characteristics of Human Skeletal Muscle Cells in Primary Culture. *Int. J. Morphol.* 40, 521–529 (2022).
- 52. Helen M. Blau, G. K., Pavlath, E. C. H. & Choy-Pik Chiu, Laura Silberstein, Steven G. Webster Steven C. Miller, C. W. Plasticity of the Differentiated State. *Science (80-.).* **230**, 758–766 (1985).
- 53. Weber, C. O. & Virchow, R. Anatomische Untersuchung einer hypertrophischen Zunge nebst Bemerkungen über die Neubildung quergestreifter Muskelfasern. *Arch. für Pathol. Anat. und Physiol. und für Klin. Med.* **7**, 115–125 (1854).
- 54. Stout, A. P. Rhabdomyosarcoma of the skeletal muscles. Ann. Surg. **123**, 447–472 (1946).

- 55. Kashi, V. P., Hatley, M. E. & Galindo, R. L. Probing for a deeper understanding of rhabdomyosarcoma: Insights from complementary model systems. *Nat. Rev. Cancer* **15**, 426–439 (2015).
- 56. Diller, L., Sexsmith, E., Gottlieb, A., Li, F. P. & Malkin, D. Germline p53 mutations are frequently detected in young children with rhabdomyosarcoma. *J. Clin. Invest.* **95**, 1606–1611 (1995).
- 57. Samuel, D. P., Tsokos, M. & DeBaun, M. R. Hemihypertrophy and a poorly differentiated embryonal rhabdomyosarcoma of the pelvis. *Med. Pediatr. Oncol.* **32**, 38–43 (1999).
- 58. Dantonello, T. M. *et al.* Initial patient characteristics can predict pattern and risk of relapse in localized rhabdomyosarcoma. *J. Clin. Oncol.* **26**, 406–413 (2008).
- 59. National Cancer Institute. Tratamiento del rabdomiosarcoma infantil. *Natl. Cancer Inst.* 1–130 (2019).
- 60. Ognjanovic, S., Linabery, A. M., Charbonneau, B. & Ross, J. A. Trends in childhood rhabdomyosarcoma incidence and survival in the United States, 1975-2005. *Cancer* **115**, 4218–4226 (2009).
- 61. Amer, K. M. *et al.* Epidemiology, Incidence, and Survival of Rhabdomyosarcoma Subtypes: SEER and ICES Database Analysis. *J. Orthop. Res.* **37**, 2226–2230 (2019).
- 62. Bodine, S. C. *et al.* Akt/mTOR pathway is a crucial regulator of skeletal muscle hypertrophy and can prevent muscle atrophy in vivo. *Nat. Cell Biol.* **3**, 1014–1019 (2001).
- Hitachi, K. & Tsuchida, K. Role of microRNAs in skeletal muscle hypertrophy. *Front. Physiol.* 4 JAN, 1–8 (2014).
- 64. Stitt, T. N. *et al.* The IGF-1/PI3K/Akt pathway prevents expression of muscle atrophy-induced ubiquitin ligases by inhibiting FOXO transcription factors. *Mol. Cell* **14**, 395–403 (2004).
- 65. Russell, A. P. Molecular regulation of skeletal muscle mass. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **37**, 378–384 (2010).
- Porta, C., Paglino, C. & Mosca, A. Targeting PI3K/Akt/mTOR signaling in cancer. *Front. Oncol.* 4
 APR, 1–11 (2014).
- 67. Hennessy, B. T., Smith, D. L., Ram, P. T., Lu, Y. & Mills, G. B. Exploiting the PI3K/AKT pathway for cancer drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* **4**, 988–1004 (2005).
- 68. Wei, Z., Xia, K., Zheng, D., Gong, C. & Guo, W. RILP inhibits tumor progression in osteosarcoma

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

via Grb10-mediated inhibition of the PI3K/AKT/mTOR pathway. Mol. Med. 29, (2023).

- 69. Yan, W., Ma, X., Zhao, X. & Zhang, S. Baicalein induces apoptosis and autophagy of breast cancer cells via inhibiting PI3K/AKT pathway in vivo and vitro. *Drug Des. Devel. Ther.* **12**, 3961–3972 (2018).
- Buitrago, C., Pardo, V. G. & Boland, R. Role of VDR in 1α,25-dihydroxyvitamin D3-dependent non-genomic activation of MAPKs, Src and Akt in skeletal muscle cells. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 136, 125–130 (2013).
- Staal, S. P. Molecular cloning of the akt oncogene and its human homologues AKT1 and AKT2: Amplification of AKT1 in a primary human gastric adenocarcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 84, 5034–5037 (1987).
- 72. Manning, B. D. & Toker, A. AKT/PKB Signaling: Navigating the Network. *Cell* **169**, 381–405 (2017).
- 73. Kristina Parr, M. & Müller-Schöll, A. Pharmacology of doping agents—mechanisms promoting muscle hypertrophy. *AIMS Mol. Sci.* **5**, 145–155 (2018).
- 74. Sepulveda, P. V, Bush, E. D. & Baar, K. Pharmacology of manipulating lean body mass. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* vol. 42 1–13 (2015).
- 75. Bellacosa, A., Kumar, C. C., Cristofano, A. Di & Testa, J. R. Activation of AKT kinases in cancer: Implications for therapeutic targeting. *Adv. Cancer Res.* **94**, 29–86 (2005).
- 76. Hiles, I. D. *et al.* Phosphatidylinositol 3-kinase: Structure and expression of the 110 kd catalytic subunit. *Cell* **70**, 419–429 (1992).
- 77. Miralem, T. *et al.* Interaction of human biliverdin reductase with Akt/protein kinase B and phosphatidylinositol-dependent kinase 1 regulates glycogen synthase kinase 3 activity: A novel mechanism of Akt activation. *FASEB J.* **30**, 2926–2944 (2016).
- 78. Cao, Z. et al. AKT and ERK dual inhibitors: The way forward? Cancer Lett. 459, 30–40 (2019).
- 79. Wei, Y., Zhou, J., Yu, H. & Jin, X. AKT phosphorylation sites of Ser473 and Thr308 regulate AKT degradation. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **83**, 429–435 (2019).
- Matheny, R. W. & Adamo, M. L. Current perspectives on akt akt-ivation and akt-ions. *Exp. Biol. Med.* 234, 1264–1270 (2009).
- Gagliardi, P. A., Puliafito, A. & Primo, L. PDK1: At the crossroad of cancer signaling pathways. Semin. Cancer Biol. 48, 27–35 (2018).

- Cen, L. *et al.* PDK-1/AKT pathway as a novel therapeutic target in rhabdomyosarcoma cells using OSU-03012 compound. *Br. J. Cancer* 97, 785–791 (2007).
- 83. Martini, M., De Santis, M. C., Braccini, L., Gulluni, F. & Hirsch, E. PI3K/AKT signaling pathway and cancer: An updated review. *Annals of Medicine* vol. 46 372–383 (2014).
- 84. Nitulescu, G. M. *et al.* Akt inhibitors in cancer treatment: The long journey from drug discovery to clinical use (Review). *International Journal of Oncology* vol. 48 869–885 (2016).
- 85. O'Donnell, J. S., Massi, D., Teng, M. W. L. & Mandala, M. PI3K-AKT-mTOR inhibition in cancer immunotherapy, redux. *Semin. Cancer Biol.* **48**, 91–103 (2018).
- 86. Dubrovska, A. *et al.* The role of PTEN/Akt/PI3K signaling in the maintenance and viability of prostate cancer stem-like cell populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 268–273 (2009).
- 87. Glaviano, A. *et al.* PI3K/AKT/mTOR signaling transduction pathway and targeted therapies in cancer. *Mol. Cancer* **22**, 1–37 (2023).
- 88. Palabiyik, O. *et al.* Alteration in cardiac PI3K/Akt/mTOR and ERK signaling pathways with the use of growth hormone and swimming, and the roles of miR21 and miR133. *Biomed. Reports* **10**, 97–106 (2019).
- 89. Mendoza, M. C., Er, E. E. & Blenis, J. The Ras-ERK and PI3K-mTOR pathways: Cross-talk and compensation. *Trends Biochem. Sci.* **36**, 320–328 (2011).
- 90. Sven Zimmermann and Karin Moelling. Phosphorylation and Regulation of Raf by Akt (Protein Kinase B). **286**, 1741–1744 (1999).
- Vlahos, C. J., Matter, W. F., Hui, K. Y. & Brown, R. F. A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3kinase, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002). J. Biol. Chem. 269, 5241–5248 (1994).
- 92. Ikezoe, T. *et al.* Longitudinal inhibition of PI3K/Akt/mTOR signaling by LY294002 and rapamycin induces growth arrest of adult T-cell leukemia cells. *Leuk. Res.* **31**, 673–682 (2007).
- 93. Chiosis, G., Rosen, N. & Sepp-Lorenzino, L. LY294002-geldanamycin heterodimers as selective inhibitors of the PI3K and PI3K-related family. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **11**, 909–913 (2001).
- 94. Abbott, B. M. & Thompson, P. E. PDE2 inhibition by the PI3 kinase inhibitor LY294002 and analogues. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **14**, 2847–2851 (2004).
- 95. Arrowsmith, C. H. et al. The promise and peril of chemical probes. Nat. Chem. Biol. 11, 536–41

(2015).

- 96. Ehrhardt, M., Craveiro, R. B., Holst, M. I., Pietsch, T. & Dilloo, D. The PI3K inhibitor GDC-0941 displays promising in vitro and in vivo efficacy for targeted medulloblastoma therapy. *Oncotarget* **6**, 802–813 (2015).
- 97. Li, X. *et al.* Efficacy of PI3K/AKT/mTOR pathway inhibitors for the treatment of advanced solid cancers: A literature-based meta-analysis of 46 randomised control trials. *PLoS One* **13**, e0192464 (2018).
- Kuramoto, N. *et al.* Role of PDK1 in skeletal muscle hypertrophy induced by mechanical load.
 Sci. Rep. **11**, 3447 (2021).
- 99. Kim, H. *et al.* Indoprofen prevents muscle wasting in aged mice through activation of PDK1/AKT pathway. *J. Cachexia. Sarcopenia Muscle* **11**, 1070–1088 (2020).
- 100. Azevedo, C. M. G. *et al.* Pyranoxanthones: Synthesis, growth inhibitory activity on human tumor cell lines and determination of their lipophilicity in two membrane models. *Eur. J. Med. Chem.*69, 798–816 (2013).
- 101. García-Rivera, D., Delgado, R., Bougarne, N., Haegeman, G. & Vanden Berghe, W. Gallic acid indanone and mangiferin xanthone are strong determinants of immunosuppressive anti-tumour effects of Mangifera indica L. bark in MDA-MB231 breast cancer cells. *Cancer Lett.* **305**, 21–31 (2011).
- Gao, X. M. et al. Identification and evaluation of apoptotic compounds from Garcinia oligantha. Bioorganic Med. Chem. Lett. 22, 2350–2353 (2012).
- 103. Scoccia, J. *et al.* Iron(II) promoted direct synthesis of dibenzo[b,e]oxepin-11(6H)-one derivatives with biological activity. A short synthesis of doxepin. *Tetrahedron* **73**, 2913–2922 (2017).
- 104. Menéndez, C. A., Nador, F., Radivoy, G. & Gerbino, D. C. One-step synthesis of xanthones catalyzed by a highly efficient copper-based magnetically recoverable nanocatalyst. *Org. Lett.* 16, 2846–2849 (2014).
- Armarego, W. L. F. & Perrin, D. D. Purification of Laboratory Chemicals. *Purif. Lab. Chem. -*Fourth Ed. 1–529 (1988) doi:10.1016/C2009-0-26589-5.
- 106. Hari, G. S., Lee, Y. R., Wang, X., Lyoo, W. S. & Kim, S. H. New synthetic routes to acronycine, noracronycine, and their analogues. *Bull. Korean Chem. Soc.* **31**, 2406–2409 (2010).
- 107. Grover, P. K., Shah, G. D. & Shah, R. C. Xanthones. Part I V. A New Synthesis of

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Hydroxyxanthones and Hydrozybenzophenones. J. Sci. I d. Res 13, 3982–3985 (1955).

- 108. Castro, M. M. & Castro, M. M. Manual de cultivo celular. 0–71.
- 109. Laemmli, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–685 (1970).
- 110. Morgan, H. P. *et al.* The trypanocidal drug suramin and other trypan blue mimetics are inhibitors of pyruvate kinases and bind to the adenosine site. *J. Biol. Chem.* **286**, 31232–31240 (2011).
- 111. Instituto de Investigaciones Biomédicas 'Alberto Sols'. Protocolo de ensayo de herida. 1–14 (2013).
- 112. Kam, Y., Guess, C., Estrada, L., Weidow, B. & Quaranta, V. A novel circular invasion assay mimics in vivo invasive behavior of cancer cell lines and distinguishes single-cell motility in vitro. BMC Cancer 8, 1–12 (2008).
- 113. Yarrow, J. C., Perlman, Z. E., Westwood, N. J. & Mitchison, T. J. A high-throughput cell migration assay using scratch wound healing, a comparison of image-based readout methods. *BMC Biotechnol.* 4, 1–9 (2004).
- 114. Staton, C. A., Reed, M. W. R. & Brown, N. J. A critical analysis of current in vitro and in vivo angiogenesis assays. *Int. J. Exp. Pathol.* **90**, 195–221 (2009).
- 115. Irazoqui, A. P., Boland, R. L. & Buitrago, C. G. Actions of 1,25(OH)2-vitamin D3 on the cellular cycle depend on VDR and p38 MAPK in skeletal muscle cells. *J. Mol. Endocrinol.* **53**, 331–343 (2014).
- 116. Irazoqui, A. P., Gonzalez, A. & Buitrago, C. Effects of calcitriol on the cell cycle of rhabdomyosarcoma cells. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **222**, 106146 (2022).
- 117. Chazotte, B. Labeling mitochondria with mitotracker dyes. *Cold Spring Harb. Protoc.* **6**, 990–992 (2011).
- 118. Chavez-Abiega, S., Gönloh, M. L. B., Gadella, T. W. J., Bruggeman, F. J. & Goedhart, J. Single-cell imaging of ERK and Akt activation dynamics and heterogeneity induced by G-protein-coupled receptors. *J. Cell Sci.* **135**, (2022).
- 119. Geng, H., Li, R., Feng, D., Zhu, Y. & Deng, L. Role of the p38/AKT Pathway in the Promotion of Cell Proliferation by Serum Heat Inactivation. *Int. J. Mol. Sci.* **24**, (2023).
- 120. Kilic-Eren, M., Boylu, T. & Tabor, V. Targeting PI3K/Akt represses Hypoxia inducible factor-1a

activation and sensitizes Rhabdomyosarcoma and Ewing's sarcoma cells for apoptosis. *Cancer Cell Int.* **13**, 36 (2013).

- 121. Fruman, D. A. et al. The PI3K Pathway in Human Disease. Cell **170**, 605–635 (2017).
- Ahn, J. et al. Reactive oxygen species-mediated activation of the Akt/ASK1/p38 signaling cascade and p21Cip1 downregulation are required for shikonin-induced apoptosis. *Apoptosis* 18, 870–881 (2013).
- 123. Buitrago, C. G., Arango, N. S. & Boland, R. L. 1α,25(OH)2D3-dependent modulation of Akt in proliferating and differentiating C2C12 skeletal muscle cells. J. Cell. Biochem. 113, 1170–81 (2012).
- 124. Orzechowski, A., Grzelkowska, K. & Karlik, W. Effect of Quercetin and DMSO on Skeletal Myogenesis from C2C12 Skeletal Muscle Cells with Special Reference to PKB / Akt Activity , Myogenin and Bcl-2 Expression. *Basic Appl Myol* **11**, 31–44 (2001).
- 125. Chehelgerdi, M. *et al.* Progressing nanotechnology to improve targeted cancer treatment: overcoming hurdles in its clinical implementation. *Mol. Cancer* **22**, (2023).
- 126. Renshaw, J. *et al.* Dual blockade of the PI3K/AKT/mTOR (AZD8055) and RAS/MEK/ERK (AZD6244) pathways synergistically inhibits rhabdomyosarcoma cell growth in vitro and in vivo. *Clin. Cancer Res.* **19**, 5940–5951 (2013).
- 127. Wang, Y. *et al.* PI3K inhibitor LY294002, as opposed to wortmannin, enhances AKT phosphorylation in gemcitabine-resistant pancreatic cancer cells. *Int. J. Oncol.* **50**, 606–612 (2017).
- 128. Townley, H. *et al.* The efficacy of the Quercetin analogue LY294002 in immortalized cancer cell lines is related to the oxygenic and metabolic status of cells. *Int. J. Cancer Ther. Oncol.* **5**, 14 (2017).
- 129. Mora, A., Komander, D., van Aalten, D. M. F. & Alessi, D. R. PDK1, the master regulator of AGC kinase signal transduction. *Semin. Cell Dev. Biol.* **15**, 161–170 (2004).
- 130. Schulze, J. O. *et al.* Bidirectional Allosteric Communication between the ATP-Binding Site and the Regulatory PIF Pocket in PDK1 Protein Kinase. *Cell Chem. Biol.* **23**, 1193–1205 (2016).
- 131. Ruiz-Carmona, S. *et al.* Dynamic undocking and the quasi-bound state as tools for drug discovery. *Nat. Chem.* **9**, 201–206 (2017).
- 132. Yang, Z.-M. et al. Design, synthesis and biological evaluation of novel 1-hydroxyl-3-aminoalkoxy

xanthone derivatives as potent anticancer agents. Eur. J. Med. Chem. 85, 487-97 (2014).

- 133. Miranda, W. E., Noskov, S. Y. & Valiente, P. A. Improving the LIE Method for Binding Free Energy Calculations of Protein-Ligand Complexes. *J. Chem. Inf. Model.* **55**, 1867–1877 (2015).
- 134. Grant, B. J., Rodrigues, A. P. C., ElSawy, K. M., McCammon, J. A. & Caves, L. S. D. Bio3d: an R package for the comparative analysis of protein structures. *Bioinformatics* 22, 2695–2696 (2006).
- 135. Perez-Lemus, G. R., Menéndez, C. A., Alvarado, W., Byléhn, F. & de Pablo, J. J. Toward widespectrum antivirals against coronaviruses: Molecular characterization of SARS-CoV-2 NSP13 helicase inhibitors. *Sci. Adv.* **8**, (2022).
- Kornev, A. P., Haste, N. M., Taylor, S. S. & Ten Eyck, L. F. Surface comparison of active and inactive protein kinases identifies a conserved activation mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103, 17783–17788 (2006).
- 137. Menéndez, C. A. *et al.* Design, synthesis and biological evaluation of 1,3-dihydroxyxanthone derivatives: Effective agents against acetylcholinesterase. *Bioorg. Chem.* **75**, 201–209 (2017).
- 138. Steingruber, H. S., Mendioroz, P., Volpe, M. A. & Gerbino, D. C. Convenient One-Pot Synthesis of
 9 H -Carbazoles by Microwave Irradiation Employing a Green Palladium-Based Nanocatalyst.
 Synth. 53, 4048–4058 (2021).
- 139. Lin, C. N. *et al.* Synthesis and antithrombotic effect of xanthone derivatives. *J. Pharm. Pharmacol.* **48**, 887–890 (1996).
- 140. Marona, H., Grka, Z. & Szneler, E. Aminoalkanolic derivatives of xanthone with potential antiepileptic activity. *Pharmazie* **53**, 219–223 (1998).
- 141. Shagufta & Ahmad, I. Recent insight into the biological activities of synthetic xanthone derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry* vol. 116 267–280 (2016).
- 142. Liu, H. S., Lin, C. N. & Won, S. J. Antitumor effect of 2,6-di(2,3-epoxypropoxy)xanthone on tumor cell lines. *Anticancer Res.* **17**, 1107–14 (1997).
- 143. Lin, C. N., Liou, S. J., Lee, T. H., Chuang, Y. C. & Won, S. J. Xanthone derivatives as potential anticancer drugs. *J. Pharm. Pharmacol.* **48**, 539–44 (1996).
- 144. McCubrey, J. A. et al. Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 1773, 1263–1284 (2007).

- 145. Palabiyik, O. *et al.* Alteration in cardiac PI3K/Akt/mTOR and ERK signaling pathways with the use of growth hormone and swimming, and the roles of miR21 and miR133. *Biomed. Reports* **10**, 97–106 (2019).
- 146. Codenotti, S. et al. Hyperactive Akt1 Signaling Increases Tumor Progression and DNA Repair in Embryonal Rhabdomyosarcoma RD Line and Confers Susceptibility to Glycolysis and Mevalonate Pathway Inhibitors. Cells 11, 1–19 (2022).
- 147. Gomtsyan, A. Heterocycles in drugs and drug discovery. *Chem. Heterocycl. Compd.* **48**, 7–10 (2012).
- 148. Lesyk, R. B. *et al.* Thiazolidinone motif in anticancer drug discovery. Experience of DH LNMU medicinal chemistry scientific group. **27**, 107–117 (2011).
- de Oliveira, J. F. *et al.* Thiosemicarbazones and 4-thiazolidinones indole-based derivatives: Synthesis, evaluation of antiproliferative activity, cell death mechanisms and topoisomerase inhibition assay. *Eur. J. Med. Chem.* **136**, 305–314 (2017).
- 150. Szychowski, K. A. *et al.* Study of novel anticancer 4-thiazolidinone derivatives. *Chem. Biol. Interact.* **262**, 46–56 (2017).
- 151. Skóra, B. *et al.* Evaluation of Anticancer and Antibacterial Activity of Four 4-Thiazolidinone-Based Derivatives. *Molecules* **27**, (2022).
- 152. Gagliardi, P. A., Puliafito, A. & Primo, L. PDK1: At the crossroad of cancer signaling pathways. *Seminars in Cancer Biology* vol. 48 27–35 (2018).
- 153. Guerrero-Zotano, A., Mayer, I. A. & Arteaga, C. L. PI3K/AKT/mTOR: role in breast cancer progression, drug resistance, and treatment. *Cancer Metastasis Rev.* **35**, 515–524 (2016).
- 154. Kobylinska, L., Lozynskii, A., Lesyk, R., Stoika, R. & Vari, S. G. Biodistribution and anticancer characteristics of les-3833, a novel 4-thiazolidinone-based lead compound. *Sci. Pharm.* **88**, 1–12 (2020).

ANEXO

Espectros de RMN de los compuestos sintetizados

1,3-dihidroxiacridin-9(10H)-ona (1).



Figura 1. ¹H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*6). Espectro de 1,3-dihidroxiacridin-9(10*H*)-ona (1).



Figura 2. ¹³C-RMN (75 MHz, DMSO-*d*6). Espectro de 1,3-dihidroxiacridin-9(10*H*)-ona (1).



Figura 3. ¹H-RMN (300 MHz, DMSO- d_6). Espectro de 3-(4-bromobutoxi)-1-hidroxiacridin-9(10*H*)-ona (2a).



Figura 4. ¹³C-RMN (75 MHz, DMSO- d_6). Espectro de 3-(4-bromobutoxi)-1-hidroxiacridin-9(10*H*)-ona (2a).



Figura 5. ¹H-RMN (300 MHz, DMSO- d_6). Espectro de 3-((5-bromopentil)oxi)-1-hidroxi-acridin-9(10*H*)- ona **(2b)**.



Figura 6. ¹³C-RMN (75 MHz, DMSO-*d*₆). Espectro de 3-((5-bromopentil)oxi)-1-hidroxi-acridin-9(10*H*)-ona **(2b)**.





Figura 7. ¹H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*₆). Espectro de 3-((6-bromohexil)oxi)-1-hidroxiacridin-9(10*H*)-ona **(2c)**.



Figura 8. ¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃). Espectro de 3-((6-bromohexil)oxi)-1-hidroxiacridin-9(10*H*)-ona (2c).

ANEXO



Figura 9. ¹H-RMN (300 MHz, DMSO- d_6). Espectro de 1-hidroxi-3-(4-morfolinobutoxi)acridin-9(10*H*)-ona (3a).



Figura 10. ¹³C-RMN (300 MHz, DMSO- d_6). Espectro de 1-hidroxi-3-(4-morfolinobutoxi)acridin-9(10*H*)ona **(3a)**.





Figura 11. ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃). Espectro de 3-((5-(dietilamino)pentil)oxi)-1-hidroxiacridin-9(10*H*)ona **(3b)**.



Figura 12. ¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃). Espectro de 3-((5-(dietilamino)pentil)oxi)-1-hidroxiacridin-9(10*H*)ona **(3b)**.





Figura 13. ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃). Espectro de 1-hidroxi-3-((5-morfolinopentil)oxi)acridin-9(10*H*)ona **(3c)**.



Figura 14. ¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃). Espectro de 1-hidroxi-3-(5-morfolinopentil)oxi)acridin-9(10*H*)-ona **(3c)**.





Figura 15. ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃). Espectro de 1-hidroxi-3-((5-(pirrolidin-1-il)pentil)oxi)acridona (3d).



Figura 16. ¹³C-RMN (75 MHz, DMSO- d_6). Espectro de 1-hidroxi-3-((5-(pirrolidin-1-il)pentil)oxi)acridona (3d).





Figura 17. ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃). Espectro de 1-hidroxi-3-((5-(piperidin-1-il)pentil)oxi)acridona (3e).



Figura 18. ¹³C-RMN (75 MHz, DMSO-*d*₆). Espectro de 1-hidroxi-3-((5-(piperidin-1-il)pentil)oxi)acridona **(3e)**.





Figura 19. ¹H-RMN (300 MHz, DMSO- d_6). Espectro de 1-hidroxi-3-((6-morfolinohexil)oxi)acridin-9(10*H*)ona **(3f)**.



Figura 20. ¹³C-RMN (75 MHz, DMSO- d_6). Espectro de 1-hidroxi-3-((6-morfolinohexil)oxi)acridin-9(10*H*)ona **(3f)**.



Figura 21. ¹H-RMN (300 MHz, DMSO-*d*₆). Espectro de 1,3-dihidroxi-9*H*-xanten-9-ona (4).



Figura 22. ¹³C-RMN (75 MHz, DMSO-*d*₆). Espectro de 1,3-dihidroxi-9*H*-xanten-9-ona (4).



Figura 23. ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃). Espectro de 3-((5-bromopentil)oxi)-1-hidroxi-9*H*-xanten-9-ona (5).



Figura 24. ¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃). Espectro de 3-((5-bromopentil)oxi)-1-hidroxi-9*H*-xanten-9-ona (5).



Figura 25. ¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃). Espectro de 3-((5-(dietilamino)pentil)oxi)-1-hidroxi-9*H*-xanten-9-ona **(6)**.



Figura 26. ¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃). Espectro de 3-((5-(dietilamino)pentil)oxi)-1-hidroxi-9*H*-xanten-9ona **(6)**.