



Pontificia Universidad Católica Argentina
“SANTA MARÍA DE LOS BUENOS AIRES”
Vicerrectorado de Investigación e Innovación Académica

PLAN DE TRABAJO

Marcar con un X el tipo de proyecto (y tema) a presentar:

<u>Proyecto tipo A</u>	
Salud: aspectos biomédicos, psicológicos y espirituales.	<u>X</u>
Ambiente, energía y producción.	
Condiciones de vida de la población.	
Instituciones socioeconómicas, políticas y jurídicas.	
Fe cristiana, cultura y arte, humanismo.	
Envejecimiento poblacional en la vida de la persona, la familia y la sociedad, cambios sociodemográficos y culturales.	
Innovación y TICs en los procesos de enseñanza y aprendizaje.	
Pandemia COVID-19 y sus efectos.	
<u>Proyecto tipo B</u>	

TÍTULO

Diseño de nuevos compuestos bioactivos asistido computacionalmente para el desarrollo de fármacos con potenciales propiedades farmacológicas antitumorales y antimetastásicas contra el cáncer de mama triple negativo

1. Introducción.

Desarrollar una hipótesis o planteamiento del tema que se abordará en la investigación, haciendo énfasis en los aspectos de mayor interés para la misma y planteando las interrogantes a las que se intentará dar respuesta.

El cáncer de mama es la neoplasia diagnosticada con mayor frecuencia y la principal causa de mortalidad relacionada con el cáncer en mujeres de todo el mundo. Este abarca una amplia heterogeneidad de subtipos con diferentes características clínicas. Entre ellos, el cáncer de mama triple negativo (CMTN), que carece de la expresión de los receptores de estrógeno (RE), de progesterona (RP) y del factor de crecimiento epidérmico humano tipo 2 (HER2), se caracteriza por ser altamente agresivo y el más propenso al desarrollo de metástasis (*Sung y col., 2021; DeSantis y col., 2019*). Este subtipo de carcinoma mamario es el de peor pronóstico y representa entre el 10% y el 15% de los casos de cáncer de mama en el mundo (*Prat y col., 2015*).

Como no presenta una terapia dirigida disponible, los protocolos terapéuticos basados en la administración de quimioterápicos (antraciclinas/taxanos) constituyen el régimen de tratamiento estándar para el CMTN y están asociados a una elevada toxicidad y a una eficacia terapéutica reducida cuando se presenta resistencia a múltiples fármacos. A la vez, en muchos casos estos tratamientos inespecíficos no producen un impacto significativo en la supervivencia y no han mostrado resultados alentadores en respuesta a la progresión de la enfermedad y metástasis cerebrales (*Goldhirsch y col., 2013; Poomier y col., 2020*). Es por ello que el estudio de nuevas terapias capaces de alcanzar un beneficio terapéutico en un porcentaje más amplio de pacientes con CMTN es una necesidad clínica urgente.

El descubrimiento de fármacos es un proceso complejo y costoso en el cual convergen diversas áreas del conocimiento. Aunque el desarrollo farmacológico se ha realizado durante muchos años usando únicamente métodos experimentales, en los últimos años el diseño de fármacos asistido por computadora ha tenido un desarrollo sin precedentes gracias a los avances de diversas disciplinas como la biología molecular, la química orgánica y computacional y la bioinformática. La incorporación de métodos computacionales al esfuerzo multidisciplinario que implica el desarrollo de medicamentos, ha llevado al desarrollo de fármacos de uso clínico (*Saldívar-González y col., 2017*).

Una etapa clave en el desarrollo de nuevos agentes quimioterapéuticos es la identificación de nuevos prototipos y la optimización de los compuestos líderes. Para acelerar el proceso de descubrimiento, reducir la cantidad de candidatos para probar experimentalmente y racionalizar su elección, los modelos matemáticos aplicados a la predicción de actividades biológicas de un grupo de compuestos aportan ventajas indiscutibles. Las relaciones cuantitativas estructura-actividad (QSAR) permiten el diseño molecular dirigido de compuestos sintéticos y sustancias naturales con potencial farmacológico con el fin de potenciar y mejorar la actividad de los mismos (*Neves y col., 2018*).

La histamina es una de las moléculas más investigadas en biomedicina y todos los subtipos de receptores de histamina constituyen blancos farmacológicos prometedores o bien establecidos (*Medina y Rivera, 2010; Massari y col., 2020*). La histamina surge como nuevo agente terapéutico con capacidad de estimular al sistema inmune, al mismo tiempo de que demuestra ejercer efectos antitumorales y potenciar terapias convencionales ya aprobadas para distintos tipos de cáncer. Los receptores a histamina se encuentran presentes en células y tumores tanto humanos como también en modelos animales y se encuentran involucrados en procesos asociados a la progresión tumoral en la mayoría de los tipos tumorales (*Medina y Rivera 2010; Medina y col., 2013; Deiteren y col., 2015; Nicoud y col., 2019; Massari y col., 2020*).

Nuestros estudios previos demuestran la expresión del receptor histaminérgico de tipo H3 (RH3) en lesiones humanas benignas y malignas, y en líneas celulares derivadas de la glándula mamaria humana. Sus niveles de expresión se correlacionaron con la proliferación celular en muestras de pacientes con cáncer de mama. (*Medina y col., 2006, 2008*). Ligandos antagonistas del RH3 han demostrado reducir el crecimiento de tumores de CMTN (*Martinel Lamas y col., 2013*). Recientemente se desarrolló una novedosa serie de compuestos sintéticos derivados de piperazinas con excelente selectividad y alta afinidad por el RH3 (*Correa y col., 2017, 2018, 2021*). Estos compuestos son buenos candidatos para su evaluación como agentes antitumorales, lo que se estudiará en el marco de este proyecto.

En la actualidad se ha difundido la búsqueda de compuestos químicos aislados de fuentes naturales con potenciales actividades biológicas (*Medina-Franco y col., 2013*). En este sentido, la levoglucosenona es un compuesto derivado de una fuente natural renovable que se obtiene a partir del tratamiento pirolítico de celulosa, un desecho. Ésta se ha utilizado como base para la síntesis de una amplia variedad de derivados con diferentes actividades biológicas, entre ellas han mostrado promisoría actividad antitumoral en cáncer de mama (*Tsai y col., 2018, 2020; Delbart y col., 2021*).

Es por lo tanto de interés en este proyecto multidisciplinario abordar el diseño racional de compuestos bioactivos mediante estudios de QSAR como estrategia para optimizar el desarrollo de fármacos.

Nuestra hipótesis indica que novedosos compuestos sintéticos derivados de familias de piperazinas y de levoglucosenona, y diseñados mediante QSAR, presentan potentes actividades antitumorales y antimetastásicas para el tratamiento del CMTN.

2. Objetivos generales.

El objetivo general de este proyecto es realizar el diseño racional de compuestos bioactivos con potenciales propiedades farmacológicas antitumorales y antimetastásicas mediante estudios de QSAR.

3. Objetivos específicos.

Desafortunadamente, el tratamiento de CMTN sigue siendo un problema clínico debido a su pronóstico relativamente pobre, su agresividad y la falta de terapias dirigidas, dejando a la quimioterapia inespecífica y tóxica como el pilar del tratamiento. Por ello es esencial encontrar nuevos agentes terapéuticos para el CMTN. Para corroborar la hipótesis y sobre la base de los antecedentes presentados, nos planteamos los siguientes objetivos específicos:

1) Evaluar la actividad antitumoral y antimetastásica *in vitro* para el CMTN de compuestos orgánicos sintéticos con potenciales propiedades anticancerígenas. Se realizará la evaluación de la actividad biológica *in vitro* de novedosas familias de compuestos:

- derivados de piperazinas que mostraron una excelente selectividad y alta afinidad por el RH3 humano.
- derivados de levoglucosenona que demostraron promisorio actividad antitumoral en tumores con p53 mutado.

2) Realizar estudios de QSAR para cada familia de compuestos y diseñar racionalmente análogos que posean mejoras en la eficacia terapéutica.

3) Síntesis de análogos mejorados y evaluación de la actividad biológica antitumoral y antimetastásica *in vitro* e *in vivo* en modelos experimentales de CMTN.

Creemos que la colaboración multidisciplinaria entre las áreas de las ciencias médicas, farmacología, química orgánica y computacional, e inteligencia artificial hará posible una mejor contribución al desarrollo de estrategias terapéuticas innovadoras que proporcionen una mejor calidad de vida al paciente oncológico.

4. Antecedentes y Justificación.

Indicar el marco teórico de la investigación y las hipótesis de trabajo propuestas consignando, sobre qué otros trabajos de investigación propios o de contribuciones de terceros, se basan. Explicar en qué medida la investigación constituirá un aporte al campo del saber en el que se encuentra y por qué debería ser financiada o ser tenida en cuenta académicamente.

El cáncer es hoy en día una de las principales causas de mortalidad en todo el mundo, siendo la diseminación metastásica del tumor primario en órganos distantes la responsable de la mayoría de las muertes. En particular, el cáncer de mama es la neoplasia más frecuentemente diagnosticada y la principal causa de muerte por cáncer en mujeres en todo el mundo y tanto su incidencia como su mortalidad continúan progresivamente en aumento

(Sung y col., 2021; DeSantis y col., 2019). En la Argentina es el cáncer con mayor número de casos incidentes (32,1% en mujeres) y representa el 19,5% de las muertes por cáncer en mujeres (INC, MSAL).

Es una enfermedad heterogénea en términos de presentación, perfil molecular y respuesta clínica a la terapia. Los tumores que expresan receptores hormonales son tumores más diferenciados asociados a pacientes con mejor pronóstico que los que sobreexpresan HER2 o aquellos sin receptores hormonales ni HER2 (CMTN). Estos últimos, representan el 10-15% de los casos de cáncer mamario, siendo un subtipo particularmente agresivo, asociado a una mayor incidencia de metástasis, mayores tasas de recaída, y afectando a un mayor porcentaje de mujeres jóvenes comparado con otros subtipos de cáncer mamario (Goldhirsch y col., 2013; Poomier y col., 2020). El CMTN al no presentar biomarcadores para el uso racional de tratamientos específicos, carece de terapias dirigidas, lo que contribuye a su mal pronóstico. El tratamiento loco-regional incluye la cirugía y la radioterapia. Sin embargo, la mortalidad debido al cáncer mamario se debe invariablemente a la diseminación metastásica del tumor primario a órganos distantes como pulmón, hueso, cerebro e hígado por vía linfática o sanguínea. De esta manera, entre el 30 al 70% de las pacientes con cáncer de mama recaerán tras el tratamiento loco-regional por micrometástasis presentes ya al momento del diagnóstico, lo que hace necesario un tratamiento sistémico adyuvante. En la actualidad, los protocolos terapéuticos basados en la administración de quimioterápicos (antraciclinas/taxanos), constituyen el régimen de tratamiento estándar para el CMTN y están asociados a una elevada toxicidad a la vez de que en muchos casos no producen un impacto significativo en la supervivencia y no han mostrado resultados muy alentadores en respuesta a la progresión de la enfermedad y el desarrollo de metástasis cerebrales (Sharma y col., 2015; Prat y col., 2015; Bao y col., 2019).

De esta manera, el desarrollo de agentes quimioterapéuticos es sumamente necesario teniendo en cuenta los problemas asociados a las terapias sistémicas existentes altamente tóxicas, los costos elevados y la limitada supervivencia libre de enfermedad de estas pacientes. Estas consideraciones, sumadas a la baja tasa de aprobación de nuevos fármacos (se estima que 1 de cada 100.000 nuevas moléculas llegan al mercado), hace del descubrimiento de nuevos compuestos bioactivos un área de suma importancia en la actualidad.

Una etapa clave en el desarrollo de nuevos agentes quimioterapéuticos es la identificación de nuevos compuestos cabeza de serie y la optimización de los líderes. Muchos de los fármacos hoy disponibles en la industria farmacéutica fueron hallados en su momento mediante técnicas de cribado (*screening*) convencionales; consistentes en evaluar el mayor número posible de sustancias tanto de origen natural como sintético, elegidas más o menos al azar en una batería lo más amplia posible de ensayos biológicos. Con este procedimiento se consiguen identificar nuevos líderes, o moléculas prototipo pertenecientes a una clase estructural determinada y con potencial en un área terapéutica concreta. Modificaciones químicas subsiguientes tienden a producir análogos de esas estructuras con una mayor actividad o una menor incidencia de efectos adversos. Este método de descubrimiento de nuevos agentes con actividad biológica es interesante desde el punto de vista que puede convertir a nuevas clases estructurales de compuestos en potenciales fármacos, pero al estar basado fundamentalmente en técnicas de ensayo y error, consume mucho tiempo y requiere grandes recursos económicos. Para incrementar la probabilidad de sintetizar un análogo activo o de encontrar un nuevo cabeza de serie se desarrollaron técnicas basadas en hallar correlaciones entre la estructura química de una serie de compuestos y su actividad biológica. De ahí surgieron los estudios de relaciones cuantitativas estructura-actividad (QSAR), muy útiles tanto en el proceso de diseño de nuevos fármacos como en la racionalización de las propiedades farmacológicas de una serie de compuestos (Neves y col., 2018; Saldívar-González y col., 2017; Medina-Franco y col., 2013; Yap y col., 2006; Sheridan y col., 2002).

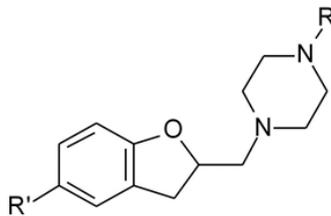
En vista de los beneficios aportados por los estudios de tipo QSAR para el desarrollo de nuevos fármacos respecto a la reducción en los tiempos y costos, en este proyecto proponemos su empleo para el desarrollo de potentes compuestos con acción antitumoral y antimetastásica para el tratamiento del CMTN, partiendo de diferentes familias de compuestos orgánicos sintéticos con potenciales propiedades anticancerígenas.

La histamina, 2-(4-imidazolil)-etilamina, es una de las moléculas más investigadas en biomedicina y todos los subtipos de receptores histaminérgicos constituyen blancos farmacológicos prometedores o bien establecidos (Massari y col., 2020; Martinel Lamas y col., 2015a; Medina y Rivera, 2010). Es una amina biogénica y uno de los mediadores biológicos más generales de mamíferos, presentando numerosas funciones fisiológicas y fisiopatológicas, las que ejerce a través de la activación de 4 subtipos diferentes de receptores H1, H2, H3 y H4

(RH1, RH2, RH3, RH4). Diferentes estudios en líneas celulares, en modelos animales y ensayos clínicos en humanos, demuestran la importancia de la histamina y de sus receptores en el desarrollo y la progresión del cáncer. Actualmente, numerosos ligandos de sus receptores y también la histamina están aprobados para su uso clínico en humanos, y su implementación en terapias combinadas puede mejorar los resultados obtenidos hasta ahora por las terapias antitumorales convencionales (Sarasola y col., 2021; Massari y col., 2020; Nicoud y col., 2019; Martinel Lamas 2015b).

En lo que respecta al RH3, hemos demostrado que éste se expresa en líneas celulares humanas, en biopsias de lesiones benignas y en carcinomas mamarios. En estos últimos, la expresión del RH3 está significativamente aumentada y se correlaciona con la proliferación y con el nivel de producción de histamina (Martinel Lamas y col., 2015a; Medina y col., 2008; He y col., 2014). Estudios *in vitro*, muestran que la histamina modula la proliferación de la línea celular de CMTN humana MDA-MB-231 de manera dosis dependiente, reduciendo la proliferación principalmente a través del RH4, mientras que la aumenta levemente a través del RH3. Además, el tratamiento de estas células con el agonista Imetit aumenta la migración celular, proceso asociado a la progresión y metástasis (Medina y col., 2006; 2008). En línea con estos resultados, el uso del antagonista del RH3, OUP-186, reduce la proliferación e induce apoptosis en líneas celulares de cáncer de mama (Tanaka y col., 2016). Además, la administración *in vivo* del antagonista del RH3, JNJ10181457 disminuye el volumen de tumores xenoinjertados de MDA-MB-231 establecidos en ratones *nude* inmunodeficientes (Martinel Lamas y col., 2013).

Recientemente, el grupo del Dr. dos Santos Fernandes de la Universidad Federal de San Pablo, reportó una novedosa familia de compuestos sintéticos derivados de piperazinas (moléculas LINS01) que muestran tener acción antagonista del RH3, entre los que se encuentran aquellos con un núcleo común de dihidrobenzofuranilo-metilpiperazina con modificaciones estructurales en la base nitrógeno (R) y en el anillo aromático (R') (Correa y col., 2017, 2018, 2021), (Figura 1).



- 1a: R = H; R' = H (LINS01001)
- 1b: R = Me; R' = H (LINS01003)
- 1c: R = Allyl; R' = H (LINS01004)
- 1d: R = Ph; R' = H (LINS01005)
- 1e: R = Me; R' = Cl (LINS01007)
- 1f: R = Me; R' = Me (LINS01008)
- 1g: R = Me; R' = MeO (LINS01009)
- 1h: R = Me; R' = tBu (LINS01010)
- 1i: R = Ph; R' = Me (LINS01012)

Figura 1: Ejemplos de derivados de piperazinas con actividad antagonista para el RH3 (Correa y col., 2018).

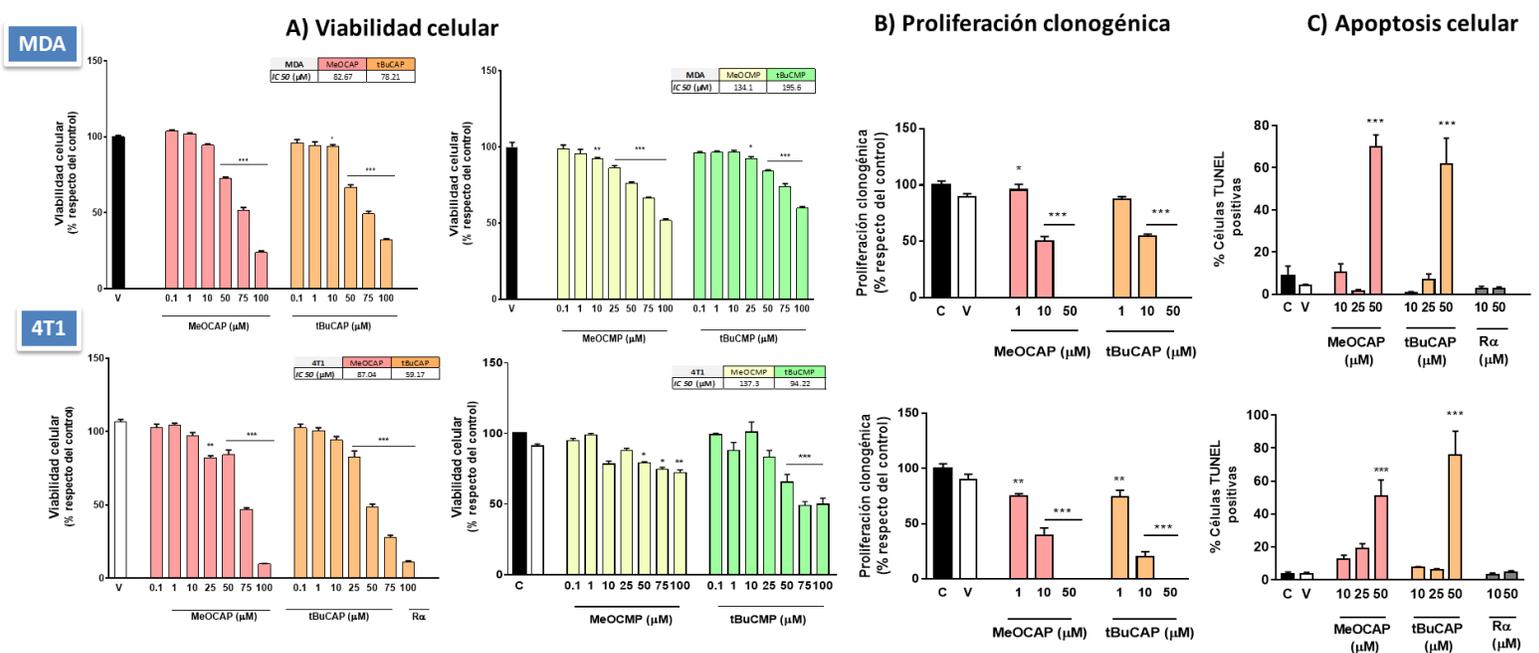


Figura 2. Efecto de los compuestos antagonistas del RH3 sobre la A) viabilidad celular, B) proliferación clonogénica y C) la apoptosis celular de células de CMTN MDA-MB-231 (MDA, panel superior) y 4T1 (panel inferior). Las barras representan la media ± ESM de 4 experimentos independientes (ANOVA y Test de Comparación Múltiple Tukey, *P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001 vs. Vehículo (V, DMSO)).

El aumento del tamaño del sustituyente R', un metoxi para **1g** (MeOCMP) o t-butilo para **1h** (tBuCMP) condujo a antagonistas del RH3 más selectivos (Correa y col., 2017; 2018). La inserción del grupo alilo para estos compuestos en R dió como resultados dos nuevos compuestos análogos, LINS01022 (MeOCAP) y LINS01023 (tBuCAP), con mayor afinidad por el RH3 (Correa y col., 2021).

Los resultados preliminares obtenidos en nuestro laboratorio indican que los compuestos (0,1-100 μ M) inhibieron la viabilidad celular de manera dosis dependiente en las células de CMTN MDA-MB-231 y 4T1. Las alilpiperazinas MeOCAP y tBuCAP exhibieron mejores efectos antiproliferativos y proapoptóticos junto con una mayor constante de afinidad por el RH3 que sus correspondientes análogos de metilpiperazina **1g** y **1h**, respectivamente (Figura 2). Estos resultados son preliminares e inéditos del grupo de investigación al presente, están directamente relacionados con la hipótesis establecida y se muestran a fin de disminuir el grado de incertidumbre del proyecto. Los mismos han sido recientemente presentados en la LXVI Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica (SAIC), resumen 509 publicado en Medicina: 81 (2021 supl 3), p. 221, lo que demuestra la vinculación académica del grupo.

Otra característica del CMTN es la presencia de las mutaciones en p53. En este sentido, una familia de compuestos azólicos derivados de levoglucosenona han mostrado tener una promisoría actividad antitumoral específicamente en células que expresan p53 mutado (Tsai y col., 2018, 2020). La levoglucosenona 1,6-anhidro-3,4-didesoxi- β -D-glicero-hex-3-enopiranos2-ulososa es una enona bicíclica enantioméricamente pura obtenida por procesos de pirólisis de papel de desecho o celulosa (Sarotti y col., 2012; 2007). Sus características estructurales, sumado a su bajo costo, pureza y fácil obtención, la convierten en un interesante y versátil material de partida.

Empleando levoglucosenona, el grupo del Dr. Sarotti del Instituto de Química Rosario, ha sido pionero en el desarrollo de novedosos inductores quirales y ha diseñado numerosos derivados bioactivos con valor agregado y de manera sustentable (Sarotti y col., 2012; 2007; Zanardi y col., 2014; 2015; Tsai y col. 2018, 2020). Los tio-derivados sustituidos en el carbono 1-4 pueden tener propiedades citotóxicas y potencial terapéutico como agentes anticancerígenos, reduciendo la viabilidad celular de células de cáncer de útero, pulmón, mama y colon por mecanismos desconocidos que pueden involucrar la inducción de estrés oxidativo y daño al ADN (Sarnik y col., 2017). La levoglucosenona y su derivado bromado exhiben también actividades antitumorales en cáncer de mama (Delbart y col., 2021). En particular los derivados triazólicos han mostrado una muy alentadora propiedad antitumoral ligada al restablecimiento de la función de p53. Los resultados indican que dichos compuestos son capaces de inducir la muerte celular específicamente en células que expresan p53 mutado. Se evaluó la actividad antiproliferativa de un grupo de 1,2,3-triazoles derivados de levoglucosenona, empleando la línea celular MDA-MB-231. Esta línea carece del alelo *wt* en el locus *TP53* pero retiene uno mutado, permitiendo la expresión exclusiva de la proteína mutado p53R280 K endógena. Luego del tratamiento con cada compuesto individual por 48 h se evaluó la viabilidad celular mediante el ensayo de MTT. En la Tabla 1 se encuentran los resultados obtenidos para los compuestos que mostraron mejores niveles de actividad, siendo **2j** y **2p** los derivados más potentes (Tsai y col., 2018, 2020).



Tabla 1. Actividad antiproliferativa de los compuestos 2a-x contra la línea celular MDA-MB-231

Compuesto	R	IC ₅₀ (μ m)
2a	-4-NO ₂ Ph	24.8
2b	-4-CIPh	26.1
2c	-Ph	25.2
2d	-4-FPh	23.7
2e	-butilo	27.9
2f	-CH ₂ C(CH ₃)=CH ₂	26.7
2g	-2-CIPh	26.4
2h	-BrPh	22.5
2i	-4-CO ₂ HPh	23.2
2j	- α -naftilo	21.9
2k	-2,3-dicloroPh	26.0
2l	-CH ₂ (4-OCH ₃)Ph	34.8
2m	-CH ₂ (4-NO ₂)Ph	25.4
2n	-CH ₂ (β -naftilo)Ph	23.7
2o	- α -ciclohexanona	36.0
2p	-fluorenilo	18.6
2q	-ciclohexilo	24.3

En este proyecto proponemos realizar estudios de QSAR de ambas familias de compuestos para guiar el diseño racional de análogos con promisoría actividad antitumoral, con el objetivo de obtener mejoras en la eficacia terapéutica.

Los estudios de QSAR son herramientas de química computacional útiles para el diseño de fármacos asistido por computadoras, hay distintos programas que pueden ser utilizados con este fin como por ejemplo Matlab, Python o R. En términos simples QSAR es un método para construir modelos computacionales o matemáticos que intenta encontrar una correlación estadísticamente significativa entre la estructura química de compuestos orgánicos y función empleando una técnica quimiométrica. La estructura es representada por descriptores moleculares y la función corresponde a una medida biológica experimental como afinidad de unión, actividad, toxicidad o constantes de velocidad.

A partir de la identificación de los compuestos cabeza de serie o líderes de ambas familias de compuestos se planea optimizar estas estructuras líderes y sintetizar análogos activos con mejores propiedades antitumorales y antimetastásicas que se verificarán en estudios *in vitro*. Una vez corroborada su efectividad se realizarán los correspondientes ensayos *in vivo* en modelos de CMTN.

Este proyecto propone un trabajo multidisciplinar que combina la experiencia del grupo de trabajo en síntesis orgánica, modelado molecular y análisis quimiométricos con evaluaciones de actividad biológica en diferentes modelos *in vitro* e *in vivo* de CMTN para obtener compuestos con elevada actividad antitumoral y antimetastásica.

5. Diseño experimental y Métodos.

Enumerar las tareas a desarrollar y las metodologías experimentales y técnicas a emplear en el plan de trabajo propuesto para la obtención de resultados y la demostración de hipótesis. Justificar la metodología y la factibilidad del desarrollo del plan propuesto.

A continuación se describen las tareas a desarrollar y metodologías para cumplir con los **objetivos específicos** planteados en este proyecto.

La propuesta metodológica general se resume en la Figura 3.



Figura 3. Diagrama de flujo para el diseño racional asistido por computadora de nuevos compuestos bioactivos

1) **Evaluar la actividad antitumoral y antimetastásica para el CMTN de compuestos orgánicos sintéticos con potenciales propiedades anticancerígenas. Se realizará la evaluación de la actividad biológica *in vitro* de novedosas familias de compuestos:**

- **derivados de piperazinas que mostraron una excelente selectividad y alta afinidad por el RH3 humano.**
- **derivados de levoglucosenona que demostraron promisorio actividad antitumoral en líneas tumorales con p53 mutado.**

En primer lugar se estudiará *in vitro* el efecto sobre la viabilidad celular de numerosos compuestos ya sintetizados de ambas familias (Correa y col., 2017, 2019, 2020; Tsai y col., 2018) mediante el ensayo de *celltiter blue* (CTB) que consiste en observar la fluorescencia emitida por la reducción del reactivo resazurina, proceso que es únicamente llevado a cabo por células viables como reportamos previamente (Clauzure y col., 2022). Muy brevemente, las células se siembran en placas de 96 pocillos y luego de realizar los tratamientos durante 48 o 72 h de incubación, se adiciona el reactivo antes mencionado para realizar luego la determinación de la fluorescencia en el lector de placa NOVostar MicroPlate Reader.

Los compuestos derivados de piperazinas serán sintetizados por el grupo del Dr. dos Santos Fernandes (Universidad de San Pablo). Ninguno de estos compuestos presentó una afinidad considerable por RH4, RH2 o RH1 y los ensayos BRET para evaluar la actividad funcional del acoplamiento G α i indican que estos compuestos actúan como antagonistas del RH3 y ninguno presenta actividad intrínseca (Correa y col., 2018, 2021).

Los compuestos derivados de la levoglucosenona serán sintetizados por el grupo del Dr. Sarotti y la Dra. Zanardi en el Instituto de Química Rosario y en el Instituto de Investigaciones en Ingeniería Ambiental, Química y Biotecnología (INGEBIO). Se cuenta con numerosos análogos cuyas secuencias sintéticas ya han sido publicadas (Sarotti y col., 2012; 2007; Zanardi y col., 2014; 2015; Tsai y col. 2018, 2020). Muchos de ellos han mostrado promisorias actividades antitumorales contra líneas celulares con p53 mutado.

Se realizarán curvas dosis respuesta y calcularán las concentraciones inhibitorias media máxima (IC50). Se emplearán líneas celulares derivadas de CMTN metastásico: humano MDA-MB-231 (ATCC HTB-26, RE α -, RP-, HER2-/bajo) y murino 4T1 (ATCC® CRL-2539TM).

Aquellos compuestos de ambas familias que presenten mayor potencia en los ensayos de viabilidad, serán evaluados sus efectos sobre otros procesos biológicos implicados en la progresión tumoral y diseminación metastásica:

- Estudios de la capacidad proliferativa mediante el ensayo clonogénico.
- Estudio de la inducción de apoptosis celular mediante el ensayo de Anexina V-FITC por citometría de flujo, que se confirmará mediante el ensayo de TUNEL.
- Estudios de migración celular mediante el ensayo de cicatrización de la herida que se confirmará mediante el estudio de células que migran a través de la cámara de boyden (transwell) con membranas de 8 μ m de poro.
- Estudios de invasión celular utilizando las cámaras de boyden recubiertas con matrigel (simula la membrana basal), evaluando la cantidad de células que invaden, es decir que degradan proteolíticamente la matriz y atraviesan la membrana porosa hacia la cara inferior del inserto.

Para evaluar la selectividad de los efectos observados y verificar que los compuestos bioactivos produzcan el mayor efecto sobre las células tumorales sin afectar a las células normales, se estudiará el efecto sobre la viabilidad celular de aquellos compuestos con mejores actividades antitumorales en la línea no tumorigénica de mama humana HBL-100 o la MCF-10A (ATCC CRL-10317).

2) Realizar estudios de QSAR para cada familia de compuestos y diseñar racionalmente análogos que posean mejoras en la eficacia terapéutica.

Los estudios cuantitativos de relación estructura-actividad (QSAR acrónimo de *Quantitative Structure-Activity Relationships*) son un enfoque computacional bien establecido para el análisis de datos químicos. Los modelos QSAR se desarrollan estableciendo empíricamente, relaciones lineales o no lineales entre valores de descriptores químicos calculados a partir de la estructura molecular y las propiedades o bioactividades medidas experimentalmente para esas moléculas, seguidas de la aplicación de estos modelos para predecir o diseñar nuevos productos químicos con las propiedades deseadas. Históricamente, el modelado QSAR se ha aplicado en gran medida al descubrimiento de fármacos asistido por computadora.

La base de esta estrategia es la idea que la actividad fisiológica de una sustancia es función de su composición y estructura química. En quimioinformática, las moléculas están representadas por descriptores que codifican estructuras y propiedades moleculares. Empleando métodos estadísticos multivariados o aprendizaje automático (*Machine Learning*) se pueden establecer relaciones matemáticas entre los descriptores calculados y una propiedad objetivo, como en nuestro caso la actividad antitumoral.

El objetivo de las teorías QSAR es predecir propiedades o actividades biológicas o químicas que aún no han sido medidas experimentalmente, usando información que proviene de la estructura molecular. Con objeto de establecer dicha relación es un requisito indispensable calibrar el modelo con un conjunto de moléculas para las cuales se conocen los valores experimentales de la actividad, denominado conjunto molecular de calibración (*training set*). Esto nos lleva a entender que se trata de una teoría inductiva y semiempírica. La función matemática lineal o no-lineal con la que se construye el modelo se escoge arbitrariamente y el criterio práctico es apelar a aquella que brinde los mejores resultados. La conexión estructura-propiedad se puede establecer con varios métodos estadísticos que se consideran herramientas útiles como técnicas de reducción de datos, tales como: MRA, PCA, PLS, y de nuestro particular interés métodos de inteligencia artificial como pueden ser las redes neuronales artificiales (ANN) y algoritmos genéticos (GA) (Niculescu 2003; Miller y col. 2002).

Para realizar estos estudios vamos a necesitar por lo tanto, seleccionar el set de datos experimentales que permitan calibrar el modelo en base a los resultados obtenidos para la actividad biológica (obtenidos en Objetivo 1). La secuencia metodológica para esta etapa del trabajo será la siguiente:

- *Paso I:* Modelado de los compuestos y optimización de la geometría a nivel de mecánica molecular (MMFF, MMFFaq, etc). Para ello se emplearán programas como Spartan o Hyperchem.
- *Paso II:* Cálculo de los descriptores moleculares 2D y/o 3D empleando distintos paquetes de software como el-Dragon, Gaussian, Spartan, Python, OChem, KNIME RDKit, etc. (Todeschini y col., 2008; Guha y col., 2005).
- *Paso III:* Análisis quimiométricos para la correlación de los descriptores moleculares con la actividad biológica. Comenzando por evaluar correlaciones simples (como Relación Lineal Multivariada-MLR, Análisis de Componentes Principales, PCA, etc.) y de requerirlo, se emplearán métodos más sofisticados realizando selección de variables a través del uso de algoritmos genéticos (AG) y ajuste de función a través de redes neuronales artificiales (ANN), máquinas de soporte de vectores (SVM), u otro tipo de regresiones. Para la generación del modelo se requiere dividir cada familia de compuestos en un set para calibración y otro para validación. Para entrenar los modelos emplearemos programación en Python usando el módulo para ciencia de datos Scikit Learn o Matlab.
- *Paso IV:* Validación de los modelos desarrollados en la etapa anterior en los compuestos no empleados para el desarrollo del modelo (*validation set*).
- *Paso V:* Una vez que tengamos una buena descripción de correlación entre estructura molecular y actividad, se deben diseñar racionalmente y modelar con computadora nuevos compuestos análogos, calcular los descriptores moleculares para ser introducidos en la función y así predecir *in silico* cuál sería su actividad.
- *Paso VI:* Aquellos compuestos cuyos cálculos determinen que sean potencialmente el o los más activos, podrán ser sintetizados y evaluados consiguiendo así algún análogo para la serie con una actividad superior. Así la teoría QSAR también puede emplearse para describir a la actividad en términos estructurales sugiriendo paralelismos, para el descubrimiento, diseño y optimización molecular de nuevas drogas y hasta resulta posible transferir información de una serie de moléculas a otra serie distinta al disponer de mejores descripciones de la estructura molecular.

3) Síntesis de análogos mejorados y evaluación de la actividad biológica antitumoral y antimetastásica *in vitro* e *in vivo* en modelos experimentales de CMTN.

A partir de los estudios de QSAR (Objetivo 2) se sintetizarán análogos mejorados de ambas familias de compuestos en estudio y se realizará la validación de la actividad biológica antitumoral y antimetastásica *in vitro* y también se complementará con estudios *in vivo*.

El diseño y la síntesis de los compuestos derivados de piperazinas se describen detalladamente en las publicaciones del Dr. dos Santos Fernandes del Departamento de Ciencias Farmacéuticas de la Universidad de San Pablo, miembro del grupo colaborador (Correa y col., 2017, 2018, 2021). Muy brevemente, los antagonistas del RH3 se preparan a partir del correspondiente fenol 4-sustituido, al que se le incluye un grupo alil usando bromuro de alilo, y luego es isomerizado térmicamente a través de una transposición de Claisen para dar los 2-alilfenoles correspondientes con una ciclación promovida por yodo. Luego, el 2-yodo-2,3-dihidrobencofurano se emplea para reaccionar con las piperazinas correspondientes para dar los productos deseados (Correa y col., 2017; 2018).

El diseño y síntesis de los derivados de levoglucosenona, se realiza teniendo en cuenta la funcionalidad de la misma ya que contiene un grupo carbonilo α,β -insaturado susceptible a distintos ataques nucleofílicos. Levoglucosenona puede obtenerse por un proceso de pirólisis de celulosa microcristalina pretratada con ácido fosfórico, con un rendimiento total de 7 a 10%, siendo un proceso ecológico que se lleva a cabo en ausencia de solventes (Sarotti y col., 2007). El poder sintetizar compuestos de alto valor agregado a partir de levoglucosenona permitiría darle uso a una gran fracción de desechos celulósicos, como el papel, o cáscaras de soja, entre otros. Esta etapa será llevada a cabo por el grupo del Dr. Sarotti miembro del grupo colaborador y la Dra. Zanardi en colaboración entre el Instituto de Química Rosario (CONICET) y el INGEBIO. Las metodologías que potencialmente podrían emplearse se encuentran ampliamente descritas en las publicaciones previas (Sarotti y col., 2012; 2007; Zanardi y col., 2014; 2015; Tsai y col. 2018, 2020).

La caracterización estructural de todos los compuestos orgánicos se realizará mediante RMN, análisis elemental, estudios de descomposición térmica y espectroscopías FTIR, Raman, UV-vis, fluorescencia y EPR, entre otras técnicas.

Una vez obtenidos los análogos se realizarán estudios de viabilidad celular, supervivencia clonogénica, muerte celular por apoptosis, migración e invasión celular en las células MDA-MB-231 y las 4T1 como se describen en las tareas del objetivo 1.

Para confirmar la potencialidad antitumoral y antimetastásica de estos compuestos mejorados se realizarán estudios además en las células MDA-MB-231-BRM2 que deriva de las células MDA-MB-231 y que desarrolla preferentemente metástasis cerebrales con un 100% de eficiencia (Bos y col., 2009), y cedida por el Dr. Leandro Cerchietti, Cornell University.

Los compuestos líderes, serán ensayados *in vitro* para intentar identificar los potenciales mecanismos de los efectos antitumorales de los compuestos que incluyen:

- Estudio del metabolismo de especies reactivas del oxígeno (ROS) con sondas fluorescentes por citometría de flujo y medición de actividades enzimáticas (superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa) mediante técnicas espectrofotométricas.
- Evaluación de la peroxidación lipídica mediante ensayo de TBARS y de tioles totales por espectrofotometría.
- Determinación del daño al ADN mediante detección de focos de la histona fosforilada γ H2AX por inmunofluorescencia.

Aquellos compuestos de ambas familias que presenten los mejores efectos antitumorales serán evaluados en modelos de CMTN *in vivo*.

Modelos de xenoinjerto en el que las células tumorales humanas se introducen en ratones inmunocomprometidos se han utilizado ampliamente para el estudio del crecimiento del tumor y desarrollo de metástasis frente a terapias antitumorales. Sin embargo, las células tumorales humanas presentan una pobre capacidad metastásica y de producirse las metástasis, en algunos casos no reflejan la clínica. En contraste, los modelos de tumores murinos, a menudo metastatizan con mayor eficacia y las metástasis presentan

características más similares a las observadas en los pacientes con cáncer. Los modelos singénicos en ratón con la función inmune normal mediante inoculación ortotópica células de CMTN 4T1, semejan el desarrollo tumoral del CMTN humano, originando metástasis en varios órganos que incluyen pulmón, cerebro y hueso. Como en el carcinoma mamario humano, la principal causa de la morbi-mortalidad de este modelo es el desarrollo de la enfermedad metastásica espontánea durante el crecimiento tumoral primario, siendo un excelente modelo para la evaluación preclínica de compuestos antitumorales (Vyas y col., 2014).

Se desarrollarán tumores ortotópicos por inoculación en la cuarta mama del lado derecho con las células 4T1 (1×10^5 en 100 μ l de RPMI) en ratones BALB/c como se reportó previamente (Sterle y col. 2019, Nicoud y col. 2020). Cuando los tumores sean palpables los animales se separarán aleatoriamente en los grupos experimentales.

El tratamiento con los compuestos se realizará por vía intraperitoneal o subcutánea en dosis 1-20 mg/kg, tres veces por semana durante dos semanas, cuando se llevará a cabo el sacrificio y los estudios *ex vivo*.

Realizaremos los siguientes ensayos:

- La evaluación de la evolución del tamaño tumoral y la capacidad metastásica.
- Estudios anatomopatológicos de los tumores primarios y metástasis donde se determinará: celularidad, índice mitótico, proporción de áreas necróticas, infiltrado inflamatorio tumoral, índice apoptótico, evaluación de la angiogénesis con marcadores específicos.
- Determinación de la expresión en cortes de tumor por inmunohistoquímica de marcadores de proliferación y apoptosis.
- La evaluación del desarrollo de metástasis espontáneas mediante la cuantificación de nódulos metastásicos y la detección de micrometástasis en pulmones mediante disgregación y tratamiento con 6-tioguanina (solo para las células 4T1 que son resistentes) para hacer ensayos clonogénicos. El número de colonias se correlaciona con la cantidad de micrometástasis presentes en ese tejido (Martinel Lamas y col., 2017).
- Es sabido que la cirugía se considera la modalidad de tratamiento primario para el cáncer de mama. La resección de los tumores primarios 4T1 no afecta significativamente la enfermedad metastásica en este modelo (Ghochikyan y col, 2014). Por lo tanto, intentaremos caracterizar el efecto de la resección quirúrgica del tumor primario 4T1 en la respuesta al desarrollo de enfermedad metastásica frente al tratamiento con los diferentes compuestos. Se analizará la proporción de células tumorales clonogénicas en los pulmones (como se indica previamente) y se realizarán estudios histopatológicos de los tejidos para evidenciar metástasis.
- En caso que no se observen metástasis en el modelo de resección quirúrgica, se realizarán alternativamente ensayos de metástasis espontáneas por inoculación de células 4T1 en la vena de la cola (Sterle y col., 2021).

Alternativamente y como estudio complementario a la luz de los resultados que se obtengan con el modelo de CMTN 4T1, se podrá a futuro evaluar la respuesta de tumores humanos, utilizando modelos de xenotransplante en ratones *nude* que serán inoculados con células humanas MDA-MB-231.

Además, se realizarán estudios histopatológicos complementarios de tejidos de los animales para evaluar la respuesta de los tejidos sanos para determinar la selectividad de los efectos observados. Se estudiarán indicadores de funcionalidad de tejidos como son las determinaciones bioquímicas en plasma y estudios de Medicina Nuclear, como hemos analizado previamente (Martinel Lamas y col., 2015c, Tesan y col., 2017), para evaluar la toxicidad de los compuestos desarrollados.

Metodologías: *Sólo se describen los aspectos más relevantes dado que la gran mayoría de los protocolos metodológicos (estudios histopatológicos e inmunohistoquímicos, ensayos de apoptosis, proliferación, viabilidad celular, cultivo celular, inmunocitoquímica, desarrollo de modelos tumorales, etc.) fueron ya utilizados en diferentes publicaciones donde se describen detalladamente (Medina y col., 2006, 2008, Martinel Lamas y col., 2013, 2015a, 2015c; Sterle y col., 2019; Nicoud y col., 2020; Clazure y col., 2022).*

Factibilidad: El plan de trabajo propuesto se llevará a cabo fundamentalmente en el Instituto de Investigaciones Biomédicas (BIOMED, UCA-CONICET) y también en la Facultad de Química e Ingeniería-Rosario -UCA.

El BIOMED cuenta con 1400 m² de infraestructura, entre los cuales hay 14 laboratorios, 7 oficinas y depósitos, 3 cuartos de cultivo, un cuarto frío, un cuarto de material radioactivo, cuartos de equipos comunes, bioterio (100 m², con racks ventilados que se instalan la semana próxima), agua desionizada que recircula por todos los laboratorios (estéril), agua ultrapura, y cuartos de citometría y microscopía confocal. Nuestro grupo de trabajo cuenta con un laboratorio (Laboratorio de Biología Tumoral e Inflamación) con oficina y cuarto para equipos perfectamente equipados y construidos de acuerdo a los estándares del NIH (USA). Dicho laboratorio y el BIOMED cuentan con centrifugas y microcentrifugas refrigeradas, heladeras, freezers de -85°C y -20°C, disruptores ultrasónicos, bombas de vacío y sistema de filtrado para retención de filtros, fuentes de poder, granizadora de hielo, sistema de electroforesis vertical con módulos de transferencia, microscopios ópticos, kit para filtración de medios, destilador y bidestilador, espectrofotómetro, estufas de secado, lector de ELISA, balanzas analíticas, autoclaves, liofilizador, ciclador térmico con bloques para distintas temperaturas en simultáneo, etc. El instituto cuenta además con laboratorios de cultivos celulares con flujos laminares de bioseguridad, microscopio de contraste de fase y estufas gaseadas, cámara fría, oficina de administración, biblioteca, sanitarios. Equipamiento especial: ciclador térmico para PCR en tiempo real, documentador de geles, microscopio confocal, microscopio de superresolución, citómetro de flujo, contador de centelleo para multiplacas y cosechador automático de células. Además, contamos con el equipamiento y recursos de la Facultad de Química e Ingeniería-Rosario -UCA donde pertenece la Dra. Zanardi, miembro del grupo responsable. El Instituto de Investigaciones en Ingeniería Ambiental, Química y Biotecnología Aplicada (INGEBIO- ex Departamento de Inv. Institucional) cuenta con 2 laboratorios de 50 m² cada uno (Laboratorio de Biología Molecular y Laboratorio de Microbiología, respectivamente); y un tercer laboratorio de 100 m² (Laboratorio Químico) donde se hallan los equipos más importantes. El Laboratorio de Microbiología cuenta con una campana de flujo laminar. Por otra parte, posee dos espacios de oficina 100 m². Cuenta el siguiente equipamiento a disposición del grupo de investigación: Cromatógrafos gaseosos con sistema de detección FID, detector PFPD, para compuestos azufrados y fosforados. Sistema cromatográfico HPLC con detector UV-Visible. Sistema cromatográfico HPLC VARIAN PROSTAR con detector arreglo de diodos PDA y Fluorescencia. Espectrofotómetro UV-Visible. Espectrofotómetro de Absorción Atómica con horno de grafito y generador de hidruros. Centrifuga Refrigerada. Equipo portátil de medición de gases (CO₂, CH₄, H₂S, O₂). Fermentador Minofors2 HT INFORS. Termociclador MULTIGENE™. Evaporador Rotatorio. Equipos de medición de DBO y DQO. Incubadora de DBO. Agitadores orbitales. Mantas calefactoras. Estufas de cultivo y de secado. Balanzas analíticas. Microscopios ópticos con cámara de video HD (x2). Baño termostatzado con agitación. Autoclave eléctrica. Campana de flujo laminar. Lavador ultrasónico. Contador de colonias. Heladeras con freezer. Equipo de agua destilada. Instrumental e insumos generales de laboratorio químico y bacteriológico (por ej., centrifugas de pie, de mesa, y microcentrifugas, micropipetas automáticas, material de vidrio, consumibles, etc.). Ultrafreezer -80°C. Microscopio Óptico Carl Zeiss. Adicionalmente disponemos en IQUIR a través del Dr. Ariel Sarotti, de equipamiento de alta tecnología como: Espectrómetro de RMN Bruker de 300 MHz y 400 MHz, espectrofotómetro Infrarrojo Shimadzu Prestige-21, cromatógrafos varios (GC y HPLC, con diversas columnas y detectores), Equipo HPLC-MS Q-TOF Bruker, Fotopolarímetro digital Jasco DIP 1000; Horno de microondas para síntesis CEM Labmate; Horno pirolítico tubular, espectrofotómetro UV-Vis Shimadzu 1650PC, hidrogenadores marca Parr a presión normal y hasta 7 atm, ozonizador a presión atmosférica, sonicador para reacciones químicas con sonda metálica marca Sonic.

Actualmente la IR propuesta dirige un subsidio de agencia PICT-2018-03778 y un PIP 2021-2023 GI (11220200102459CO), que colaborarán con la compra de reactivos e insumos necesarios para este proyecto. Además, participa del subsidio CONICET para Proyecto de Investigación Plurianuales Unidades Ejecutoras y se cuenta con el aporte económico de la UCA. Dicho aporte se utiliza para la compra general de insumos (nitrógeno líquido, CO₂, alimento y viruta para animales de bioterio, insumos de limpieza, etc.) y para mantenimiento de equipos. Adicionalmente la Dra. Zanardi cuenta con dos subsidios vigentes uno de agencia PICT-2019-04052 y un PIP 2021-2023 (11220200102205CO) que colaborarán para los reactivos necesarios en la síntesis de derivados de levoglucosenona.

6. Referencias bibliográficas.

- Bao y col. *Cell Death Dis* 2019;10:807.
- Bos y col. *Nature* 2009; 459:1005-1009.
- Clazure y col. *Int J Mol Sci* 2022;23(3):1378.
- Correa y col. *Front Pharmacol* 2017;8:825.
- Correa y col. *Chem Biol Drug Des* 2018;93:89-95.
- Correa y col. *Bioorg Med Chem* 2021;30:115924.
- Delbart y col. *Invest New Drugs* 2022;40: 30-41.
- Deiteren y col. *Br J Pharmacol* 2015;172(5):1165-78.
- DeSantis CE, y col. *CA Cancer J Clin.* 2019;69:438-451.
- Guha y col. *J Chem Inf Model* 2005;45:800.
- Goldhirsch y col. *Ann Oncol* 2013;24:2206-23.
- Guha y col.. *J Chem Inf Model* 2005, 45, 800.
- He y col. *PLoS One* 2014;9(5):e97728.
- Martinel Lamas y col. *Br J Pharmacol* 2013 170(1):188-99.
- Martinel Lamas y col. *Front Biosci (Schol Ed)* 2015a;7:1-9.
- Martinel Lamas y col. *Cell DeathDis* 2015b;6:e2029.
- Martinel Lamas y col. *Cell Death Discov* 2015c;1:15059.
- Martinel Lamas y col. *Springer Protocols* 2017;353-387.
- Massari y col. *Br J Pharmacol* 2020;177(3):516-538.
- Medina y col. CHAPTER 8: HISTAMINE IN CANCER. En: *Histamine H4 receptor: A novel drug target in immunoregulatory and inflammatory diseases*. 2013. Editor: Holger Stark. Published by Versita.
- Medina y col. *Cancer Biol Ther* 2006;5:1462-71.
- Medina y col. *Cancer Biol Ther* 2008;7(1):27-35.
- Medina y Rivera. *British J Pharmacol* 2020;161(4):755-67.
- Medina-Franco y col. *J Chem Inf Model.* 2013 Jun 24;53(6):1475-85.
- Miller y col. *Estadística y quimiometría para química analítica*; Pearson Educación, 2002.
- Neves y col. *Front Pharmacol* 2018;9:1275.
- Nicoud y col. *Front Pharmacol* 2019;10:556.
- Nicoud y col. *Br J Cancer* 2020;122(3):348-360.
- Niculescu. *J Mol Struct (Theochem)* 2003;622:71.
- Pommier y col. *Nat Commun* 2020;11:3431.
- Prat A, y col. *Breast* 2015;24 Suppl 2:S26-35.
- Saldívar-González, y col. *Educación Química* 2017, 28:51-58.
- Sarnik y col. *Bioorg Med Chem Lett* 2017;27(5):1215-1219.
- Sarotti y col. *Green Chemistry* 2007;9:1137.
- Sarotti y col. *Current Organic Synthesis* 2012;9:439
- Sharma y col. *Surg Oncol* 2015; S0960-7404(15)30006-2.
- Sheridan y col. *Acc Chem Res* 2002;20:322.
- Sterle y col. *Br J of Cancer* 2019;120(1):128-138.
- Sterle y col. *Endocr Relat Cancer* 2021;28(7):403-418.
- Sung H, y col. *CA Cancer J Clin.* 2021;71:209-249.
- Tanaka y col. *Biochem Biophys Res Commun.* 2016 Nov 18;480(3):479-485.
- Tesan y col. *Anticancer Agents Med Chem* 2017;17(3):359-364.
- Todeschini, R.; Consonni, V. *Handbook of molecular descriptors*; John Wiley & Sons, 2008.
- Tsai y col., 2018. *The Journal of Organic Chemistry* 2018 83 (7), 3516-3528
- Tsai y col. *Bioorg Med Chem Lett* 2020;30(14):127247.
- Vyas y col. *Onco Targets Ther* 2014;7:1015-23.
- Yap y col. *Curr Top Med Chem* 2006;6:1593.
- Zanardi y col. *Tetrahedron Lett.* 2014, 55(42):5832–5835.
- Zanardi y col. *Tetrahedron Lett.* 2015, 56(24): 3762–3765.

7. Justificación del presupuesto.

Los laboratorios cuentan con infraestructura, equipamiento y personal altamente capacitado para desarrollar el proyecto; sin embargo, es necesario contar con fondos para la compra de insumos, y la difusión y publicación de los resultados. Para los 2 años de extensión del subsidio, dado el costo elevado (en muchos casos en valor dólar) de los reactivos, solicitamos que el mayor monto corresponda al rubro insumos para poder concretar las actividades propuestas. Como es sabido, la publicación y difusión de los resultados resulta en muchos casos en un costo adicional, dado que muchos de los journals exigen, luego de la aceptación, el pago de un arancel por hoja publicada y/o pago de *open access*. Por lo tanto, solicitamos un monto para el rubro publicaciones de los resultados del proyecto que será destinado justamente a la compra de espacios para la publicación de artículos y/o a la difusión de los resultados del mismo.

Primer año:

Gastos Corrientes (funcionamiento):

- Bienes de consumo: Reactivos y material consumible estéril para cultivo celular, reactivos analíticos generales de laboratorio, kits de Anexina V, Kit TUNEL, suero fetal bovino, CellTiter Blue, Transwells.
- Difusión de resultados: aporte para gastos para la publicación de resultados y gasto de inscripción a un congreso nacional.

Segundo año:

Gastos Corrientes (funcionamiento):

- Bienes de consumo: Reactivos y material consumible estéril para cultivo celular, reactivos analíticos generales de laboratorio, *transwells*, anticuerpos para citometría e inmunohistoquímica, Suero fetal bovino, CellTiter Blue, kits de Anexina V.
- Difusión de resultados: aporte para gastos para la publicación de resultados y gasto de inscripción a un congreso nacional de dos investigadores.

8. Grupo colaborador.

EN EL ANEXO 1 (pág. 16) SE DESCRIBE LA CONFORMACIÓN DEL GRUPO DE INVESTIGACIÓN (GRUPO RESPONSABLE Y GRUPO COLABORADOR) Y EL GRADO DE ARTICULACIÓN Y COMPLEMENTACIÓN DISCIPLINAR ENTRE LOS INTEGRANTES.

Apellido y nombre	Filiación institucional
Taquéz Delgado, Mónica	Becaria Doctoral UCA - BIOMED
Ospital, Ignacio	Becario UCA Iniciación, a partir del 04/2022 becario doctoral UCA-CONICET - BIOMED
Speisky, Daniela	Médica del Hospital Británico - Tesista doctoral UCA - BIOMED
Vidal, Agustina	Veterinaria a cargo del Bioterio - BIOMED
dos Santos Fernandes, João	<u>Colaborador externo</u> , Profesor del Departamento de Ciencias Farmacéuticas de la Universidad de San Pablo
Sarotti, Ariel	Profesor e Investigador de CONICET, Instituto de Química Rosario (IQUIR)

	Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. Universidad Nacional de Rosario
Luciano, Ezequiel Rodrigo	Becario UCA de Iniciación a la Investigación Facultad de Química e Ingeniería del Rosario (UCA).
Franco, Bruno Agustin	Becario UCA de Iniciación a la Investigación Facultad de Química e Ingeniería del Rosario (UCA).
María Betina Comba	Profesora (UCA-UNR) e Investigadora UCA. Facultad de Química e Ingeniería del Rosario (UCA).
Maribel Oriana Marcarino	Becaria Conicet. Instituto de Química Rosario (IQUIR) Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. UNR.
Baeza, Rosa	Profesora e Investigadora UCA. Facultad de Ingeniería y Cs. Agrarias, UCA SEDE Buenos Aires
Sánchez, Virginia	Profesora e Investigadora UCA. Facultad de Ingeniería y Cs. Agrarias, UCA SEDE Buenos Aires
Busso Casati, Carolina	Profesora e Investigadora UCA. Facultad de Ingeniería y Cs. Agrarias, UCA SEDE Buenos Aires
Formoso, Karina	Investigadora asistente de CONICET. Ingresó en convocatoria CIC 2020 - BIOMED

9. Cronograma de trabajo.

Tarea	Tiempo estimado							
	Primer año				Segundo año			
1. <i>Evaluar la actividad antitumoral y antimetastásica para el CMTN de compuestos orgánicos sintéticos con potenciales propiedades anticancerígenas (Obj. 1)</i>								
2. <i>Desarrollo de modelos de relación estructura actividad (QSAR) (Obj. 2)</i>								
3. <i>Síntesis de análogos mejorados (Obj. 3)</i>								
4. <i>Evaluación de la actividad biológica antitumoral y antimetastásica de análogos in vitro e in vivo en modelos experimentales de CMTN (Obj. 3)</i>								

El proyecto propuesto profundiza y expande los planes de investigación que viene desarrollando el grupo de trabajo en los últimos años y está planteado para ser concretado en el periodo de tiempo estipulado en esta convocatoria. En el futuro, una vez alcanzados los objetivos propuestos, se continuará con la labor científica a la luz de los resultados obtenidos, profundizando la investigación en el tema con la generación de nuevas líneas de trabajo.

ANEXO 1

CONFORMACIÓN DEL GRUPO DE INVESTIGACIÓN

Grado de articulación y complementación disciplinar entre los integrantes.

La IR y gran parte de los y las investigadores del grupo responsable y miembros del grupo de colaboradores forman un grupo consolidado que interactúa desde hace años lo que se refleja en las publicaciones anteriormente mencionadas.

La **Dra. Melisa Nicoud**, Doctora de la UBA, realizó su doctorado bajo la dirección de la Dra. Vanina Medina estudiando la importancia inmunomoduladora del RH4 en cáncer de mama. Es Lic. en Física Médica de la UNLP. Docente en la Facultad de Farmacia y Bioquímica (FFyB), UBA. Actualmente tiene una beca postdoctoral cofinanciada entre CONICET y UCA bajo la dirección de la Dra. Vanina Medina. Está altamente capacitada para el trabajo con animales de laboratorio y líneas celulares en cultivo, y está ampliamente entrenada en la mayoría de las metodologías necesarias para llevar a cabo este proyecto. Será la principal responsable de los estudios *in vivo* en ratones BALB/c. Colaborará con la formación y dirección del recientemente incorporado **tesinista de licenciatura Ignacio Ospital**, estudiante de la carrera de biotecnología de la UADE que está próximo a defender su tesis y ha sido beneficiado con una beca doctoral cofinanciada UCA-CONICET para llevar a cabo su tesis doctoral en BIOMED. Colaborará con el cultivo celular y con el cuidado de los animales, controles periódicos, tratamientos, sacrificio, necropsia. La **Mg. Mónica Táquez Delgado**, Magíster en Biología Molecular Médica con orientación en Genética Molecular de la UBA y Lic. en química. Es becaria doctoral de la UCA (BIOMED) bajo la dirección de la Dra. Vanina Medina. Posee gran experiencia en el desarrollo de técnicas moleculares, cultivo celular y ensayos pre-clínicos. Será la principal responsable de la realización de las técnicas de inmunohistoquímica, será responsable de la realización de estudios *in vitro* e *in vivo* para evaluar el efecto antitumoral de los compuestos. La **Dra. Daniela Speisky**, Médica patóloga del Hospital Británico (HB) de Buenos Aires. Ha comenzado a desarrollar en 2019 su tesis doctoral bajo la dirección de la Dra. Vanina Medina. Llevará a cabo todas las observaciones y descripciones histopatológicas. La **Vet. Ma. Agustina Vidal**, actualmente trabaja como personal de apoyo en el bioterio del instituto BIOMED donde se alojarán los animales. Ella colaborará con el cuidado de los animales, controles periódicos, tratamientos, sacrificio, necropsia. La **Dra. Karina Formoso**, es Bióloga, especializada en biología celular y molecular de la UBA. Actualmente se encuentra realizando un segundo posdoctorado bajo la dirección del Dr. Frank Lezoualc'h en la dependencia del INSERM especializada en Enfermedades Metabólicas y Cardiovasculares, en la Universidad Paul Sabatier en Toulouse, Francia. Ha ingresado a CIC como Investigadora Asistente de CONICET en esta última convocatoria (2020) bajo la dirección de la Dra. Vanina Medina. Está altamente capacitada para el trabajo con animales de laboratorio y líneas celulares en cultivo y estudios de vías de señalización. Colaborará con la realización de las pruebas de viabilidad celular y experimentos *in vivo*. El **Prof. Dr. João Paulo S. Fernandes**, con filiación en el Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de São Paulo, Diadema, Brazil brindará los novedosos ligandos farmacológicos del RH3 en el marco de la colaboración ya establecida. La **Dra. Graciela Cremaschi**, Investigadora Superior de CONICET (BIOMED), Profesora Asociada, dedicación simple, FFyB, UBA. Posee una gran experticia en oncología molecular e inmunomodulación y colaborará conjuntamente con la **Dra. Helena Sterle**, investigadora asistente de CONICET bajo la dirección de la Dra. Graciela Cremaschi y la co-dirección de la Dra. Vanina Medina, en los estudios para evaluar el desarrollo de metástasis en modelos *in vivo*.

La **Dra. Vanina Medina**, Investigadora Independiente CONICET (BIOMED) y Profesora adjunta regular dedicación simple, FFyB (UBA), estará a cargo del diseño de los protocolos experimentales y supervisará la realización de los experimentos. Dirige al investigador asistente Dr. Martinel Lamas, dirige las tesis doctorales de la Lic. Nicoud, la Mg. Mónica Táquez Delgado, la médica Daniela Speisky y próximamente de Ignacio Ospital, guiando sus actividades científico-académicas y los capacitará en las metodologías que así lo requieran. Se encargará del análisis de resultados en forma crítica validados por los análisis estadísticos conjuntamente con los tesisistas y otros miembros del grupo colaborador. Organizará seminarios de discusión para favorecer la interacción entre los miembros del grupo y con otros investigadores. Redactará los artículos para su publicación conjuntamente con los investigadores. También tendrá a cargo la administración de los fondos adjudicados y la redacción de los informes.

La **Dra. María Marta Zanardi** es investigadora asistente de CONICET (INGEBIO) y docente de la FBioyF (UNR) y de la FQeIR (UCA). Es licenciada en Biotecnología, Dra. en Ciencias Químicas y realizó su post doctorado en Química Computacional con el Dr. Ariel Sarotti en el IQUIR (Conicet - UNR), que es su actual director en la carrera CIC Conicet. Adicionalmente estos años estuvo capacitándose en el área de programación en Python e Inteligencia Artificial, habiendo realizado trabajos en el área de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) empleando Redes Neuronales Artificiales y Regresiones de Kernel Ridge. Por su formación de grado en ciencias biológicas y de postgrado en síntesis orgánica es una persona capaz de integrar las distintas áreas de estos proyectos multidisciplinares. Actualmente se encuentra dirigiendo la tesina del alumno **Bruno Agustín Franco** (estudiante terminando la Lic. en Química en la FBioyF, UNR). También dirige la beca de iniciación a la investigación de **Ezequiel Rodrigo Luciano**, estudiante terminando la Lic. en Química en la FBioyF, UNR, docente de la misma casa de estudios y docente del Instituto Politécnico de Rosario. Recientemente comenzó a dirigir a la Investigadora UCA **María Betina Comba**, Lic. en Biotecnología y Dra. en Ciencias Químicas con una vasta experiencia en síntesis orgánica y caracterización estructural de compuestos, docente de la FBioyF (UNR), de la FQeIR (UCA). En el IQUIR se encuentra co-dirigiendo la tesis doctoral de la Lic. en Química **Maribel Marcarino**, en el tema de desarrollo de métodos computacionales para elucidación estructural de nuevos compuestos orgánicos, junto al **Dr. Ariel Sarotti**. Este último es Lic en química de la UCA, Dr. en Ciencias Químicas, Investigador Independiente de CONICET, Profesor Asociado - Dedicación Exclusiva del Departamento de Química Orgánica, FBioyF, U.N.R. Cuenta con una gran experiencia en síntesis orgánica, desarrollo de métodos computacionales, programación e inteligencia artificial. Este grupo estará encargado de realizar el modelado molecular de los compuestos, cálculo de los descriptores moleculares y entrenamiento del modelo QSAR, seguido del diseño racional de nuevos análogos, evaluación de actividades *in silico* y síntesis de los análogos más prometedores derivados de levoglucosenona.

Las **Dras. Rosa Baeza, Virginia Sánchez y Carolina Busso Casati**, todas profesoras e Investigadoras UCA, se desempeñan en la Facultad de Ingeniería y Ciencias Agrarias de la UCA (Buenos Aires), y conforman un grupo de trabajo que se encuentran investigando en la temática de compuestos antioxidantes provenientes de frutos rojos, vino y otros alimentos. Están altamente capacitadas en diversas técnicas para caracterizar fisicoquímicamente y evaluar los niveles de compuestos bioactivos y su capacidad antioxidante. Colaborarán en las determinaciones de especies reactivas del oxígeno y en las determinaciones de la actividad de enzimas antioxidantes.

Por todo lo anteriormente expuesto y lo consignado en la sección de antecedentes y justificación, consideramos que nuestro grupo de investigación demuestra experticia en el trabajo con modelos experimentales animales y ensayos biológicos, farmacología, inmunooncología, química orgánica, química computacional, inteligencia artificial, y además tiene una intensa actividad de investigación, lo que garantiza el desarrollo del proyecto que se presenta.

Es de destacar que el desarrollo del proyecto fortalecerá las acciones interinstitucionales de cooperación, complementación y colaboración a fin de mejorar los índices de producción científica e intercambio de conocimientos y muy importante, redundará en una mejor y más rica formación de recursos humanos. Es un trabajo multidisciplinario que se enriquecerá con el aporte de cada institución.